

**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**AVALIAÇÃO DE MEDIADORES SOLÚVEIS NO ASPIRADO TRAQUEAL E SORO  
DE PACIENTES COM COVID-19: BUSCA DE BIOMARCADORES DE  
PROGNÓSTICO PARA INFECÇÃO POR SARS-CoV-2**

por  
JUAN JONATHAN GONÇALVES

Belo Horizonte

2022

**DISSERTAÇÃO MCS-IRR J.J. GONÇALVES 2022**

**JUAN JONATHAN GONÇALVES**

**AVALIAÇÃO DE MEDIADORES SOLÚVEIS NO ASPIRADO TRAQUEAL E SORO  
DE PACIENTES COM COVID-19: BUSCA DE BIOMARCADORES DE  
PROGNÓSTICO PARA INFECÇÃO POR SARS-CoV-2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde – área de concentração em Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática

Orientação: Dr. Olindo Assis Martins Filho

Coorientação: Dra. Jordana Graziella

Coelho Dos Reis

Belo Horizonte

2022

O presente trabalho foi realizado com apoio de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) - Código de Financiamento 001.

G635a Gonçalves, Juan Jonatham.  
2022

Avaliação de mediadores solúveis no aspirado traqueal e soro de pacientes com covid-19: busca de biomarcadores de prognóstico para infecção por SARS-CoV-2 / Juan Jonatham Gonçalves. - Belo Horizonte, 2022.

77 f. : il. color.

Orientador: Olindo Assis Martins Filho.

Coorientadora: Jordana Graziella Coelho dos Reis.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências da Saúde),  
Belo Horizonte, 2022.

Bibliografia: f. 61-66.

1. Covid19//imunologia. 2. Citocinas/análise. 3.  
Quimiocinas/análise. I. Título.

CDD 616.203

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica:  
Segemar Oliveira Magalhães – CRB/6 1975 FIOCRUZ. Instituto René Rachou.  
Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener

**JUAN JONATHAN GONÇALVES**

**AVALIAÇÃO DE MEDIADORES SOLÚVEIS NO ASPIRADO TRAQUEAL E SORO  
DE PACIENTES COM COVID-19: BUSCA DE BIOMARCADORES DE  
PROGNÓSTICO PARA INFECÇÃO POR SARS-CoV-2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde – área de concentração em Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

**Banca examinadora:**

Dr. Olindo Assis Martins Filho (IRR) Presidente

Dra. Denise da Silveira Lemos Giunchetti (UFMG) Titular

Dr. Gregório Guilherme Almeida (IRR) Titular

Dra. Rafaela Fortini Grenfell e Queiroz (IRR) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 30/11/2022

**Eis o meu segredo: só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos. Os homens esqueceram essa verdade, mas tu não a deves esquecer. Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.**

**(Antoine de Saint-Exupéry)**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, que tem me acompanhado desde sempre e me ajudado a enfrentar todos os desafios e dificuldades, minha família que sempre foi meu alicerce e meu porto seguro.

Agradeço ao laboratório GIPB por me proporcionar tantas oportunidades de conhecimento e por terem me acolhido como integrante dessa família incrível de pesquisadores e estudantes.

Todo o meu agradecimento e gratidão ao Dr. Olindo Assis e Dra. Jordana Reis pelas orientações durante todo o meu percurso como estudante de iniciação científica e como mestrando, pois sem eles nada disso seria possível.

Agradeço ainda aos meus colegas de instituição Ana Carolina de Oliveira Costa e Camila Armormino Corsini por toda colaboração durante as disciplinas cursadas juntos, além de todos os colaboradores do Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Geras, da Divisão de Medicina Intensiva, Departamento de Cirurgia e Anatomia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-SP e também aos colaboradores do Hospital Risoleta Tolentino Neves, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, além da Biblioteca do IRR, em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrando o rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

Os meus mais sinceros agradecimentos às intuições financiadoras que viabilizaram a execução desse projeto-Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou-Fiocruz Minas.

## RESUMO

No presente estudo, mediadores imunológicos solúveis no soro e aspirado traqueal foram quantificados em pacientes com COVID-19 grave em momentos distintos (D0, D2-6, D7, D8-13 e D> 14) após admissão na Unidade de Terapia Intensiva (UTI). O perfil e a cinética de mediadores solúveis no soro e aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 foi igualmente associado ao desfecho da infecção. Para tal, foram avaliados biomarcadores imunológicos incluindo: quimiocinas, citocinas pro-inflamatórias/reguladoras e fatores de crescimento celular, utilizando ensaio multiplex com microesferas de captura (27-plex). Uma tempestade de mediadores solúveis sistêmicos e das vias aéreas foi observada em pacientes com COVID-19 grave. Um perfil modulado foi observado em amostras de aspirado traqueal, indicando que os microambientes sistêmico e local divergem em seu meio inflamatório. Enquanto uma distribuição bimodal foi observada nas amostras de soro, um pico unimodal em torno de D7 foi encontrado para a maioria dos mediadores em amostras de aspirado traqueal. Ferramentas de biologia de sistemas demonstraram ainda que a COVID-19 exibe redes de mediadores solúveis excêntricos distintos em comparação com os controles, com perfis opostos no soro e aspirado traqueal. Independentemente do microambiente sistêmico ou compartimentalizado, redes de pacientes que evoluem para óbito estavam ligadas a um centro pró-inflamatório/rico em fator de crescimento, altamente integrado. Por outro lado, os pacientes que evoluíram para alta exibiram redes com arquitetura contendo menor número de conexões de vizinhança e clusters de citocinas inflamatórias e reguladoras. Em suma, esta investigação com tamanho de amostra robusto conseguiu retratar de maneira abrangente as divergências sistêmicas e locais compostas por respostas imunes distintas mediadas pelo SARS-CoV-2 na fase recente da COVID-19 grave. Acreditamos que os conhecimentos gerados pelo presente trabalho trazem contribuição significativa para fundamentar estratégias de manejo clínico bem como seleção de imunobiológicos para tratamento de COVID-19.

**Palavras-chave:** COVID, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, biomarcadores prognósticos.

## ABSTRACT

In the present study, soluble immune mediators in serum and tracheal aspirates were quantified in patients with severe COVID-19 at different time-points (D0, D2-6, D7, D8-13 and D>14) after admission to the Intensive Care Unit (ICU). The profile and kinetics of soluble mediators in serum and tracheal aspirates from patients with COVID-19 was similarly associated with infection outcome. For this, immunological biomarkers were evaluated, including chemokines, pro-inflammatory/regulatory cytokines and cell growth factors, using multiplex assay with capture microspheres (27-plex). A massive storm of soluble systemic and airway mediators has been observed in patients with severe COVID-19. A modulated profile was observed in tracheal aspirate samples, indicating that the systemic and local microenvironments diverge in their inflammatory milieu. While a bimodal distribution was observed in serum samples, a unimodal peak around D7 was found for most mediators in tracheal aspirate samples. Systems biology tools further demonstrated that COVID-19 exhibits distinct eccentric soluble mediator networks compared to controls, with opposing profiles in serum and tracheal aspirates. Regardless of the systemic or compartmentalized microenvironment, networks of patients who died were linked to a highly integrated, pro-inflammatory/growth factor-rich core. On the other hand, patients who progressed to discharge exhibited networks with architecture containing a smaller number of neighborhood connections and clusters of inflammatory and regulatory cytokines. In summary, this investigation with a robust sample size was able to comprehensively portray the systemic and local divergences driven by distinct SARS-CoV-2-mediated immune responses in the recent phase of severe COVID-19. All in all, the knowledge generated by the present work provides a significant contribution to support clinical management strategies as well as the selection of immunobiologicals for the treatment of COVID-19.

**Key-Words:** COVID, cytokines, chemokines, growth factors, prognostic biomarkers, systemic, airway and immune mediators

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Mapa global de casos de COVID-19 em novembro de 2022 pelo Coronavírus.....	16
Figura 02: Rank de casos fatais de COVID-19.....	17
Figura 03: Variantes de interesse e variantes de preocupação do SARS-CoV-2.....	19
Figura 04: Representação esquemática da partícula viral e do genoma SARS-CoV-2.....	21
Figura 05: Ciclo replicativo do SARS-CoV-2.....	22
Figura 06: Curso clínico da COVID-19 e estágios de progressão da doença com sinais e sintomas clínicos.....	24
Figura 07: Hiperinflamação e dano alveolar. MMPs como componentes cruciais dos processos que levam à pneumonia e ao agravamento dos casos da COVID-19.....	26
Figura 08: Resumo da população de estudo e métodos.....	33
Figura 09: Avaliação de mediadores imunológicos solúveis séricos em pacientes com COVID-19 grave em admissão na UTI.....	39
Figura 10: Magnitude das alterações no soro e no sistema de mediadores imunológicos solúveis presentes nas vias aéreas de pacientes em estado grave com COVID-19.....	40
Figura 11: Análise dos mediadores imunológicos solúveis séricos de pacientes em estado grave com COVID-19 em admissão na UTI, de acordo com o desfecho da doença (alta vs óbito) .....	41
Figura 12: Matrizes de correlação integrativa e análise de redes de mediadores imunológicos solúveis séricos em pacientes com COVID-19 grave em admissão na UTI.....	43
Figura 13: Linha do tempo cinética de mediadores imunológicos solúveis em amostras de soro de pacientes com COVID-19 grave.....	45
Figura 14: Linha do tempo cinética de mediadores imunológicos solúveis séricos de pacientes com COVID-19 grave, de acordo com o resultado da doença.....	46
Figura 15: Panorama de mediadores imunológicos solúveis nas vias aéreas em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 grave em admissão na UTI.....	48

Figura 16: Perfil de mediadores imunológicos solúveis nas vias aéreas em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 grave em admissão na UTI, de acordo com o desfecho da doença.....	49
Figura 17: Matrizes de correlação de redes integrativas e análise de redes de mediadores imunológicos solúveis nas vias aéreas em aspirados traqueais de pacientes com COVID-19 grave em admissão da UTI.....	51
Figura 18: Cinética de mediadores imunológicos solúveis nas vias aéreas em amostras de aspirado traqueal de pacientes COVID-19 grave.....	53

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**ACE**– Enzima conversora da angiotensina 2

**CCDC**– Centro Chinês para Controle e Prevenção de Doenças

**CNPq** – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

**COVID**– Coronavirus disease

**CTI**–Centro de terapia intensiva

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**Fiocruz** – Fundação Oswaldo Cruz

**GISAID**- É uma iniciativa científica global e fonte primária estabelecida em 2008 que fornece acesso aberto a dados genômicos de vírus influenza e do coronavírus responsável pela pandemia de COVID-19

**HC**– Health control

**IL**–Interleucina

**IRR** – Instituto René Rachou

**MERS**– Síndrome Respiratória do Oriente Médio

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**ORFs**– Fase de leitura aberta, do inglês Open reading Frames

**RNA**– Ácido ribonucleico

**SARS**– Síndrome respiratória aguda grave

**WHO** – *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1 SARS-CoV-2.....</b>	<b>14</b>
1.1.1 Letalidade e variantes do SARS-CoV-2.....	16
1.1.2 Transmissão.....	20
1.1.3 Ciclo de multiplicação do SARS-CoV-2.....	21
1.1.4 Curso clínico, Biomarcadores e Imunologia da infecção pelo SARS-CoV-2..	23
1.1.5 Diagnóstico para COVID-19.....	28
1.1.6 Sorologia.....	28
1.1.7 RT-qPCR.....	29
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>30</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
4.1 População do estudo.....	32
4.2 Preparação de soro e aspirado traqueal.....	35
4.3 Avaliação de mediadores imunológicos solúveis em amostras de soro e aspirado traqueal.....	35
4.4 Mineração de dados e análise estatística.....	36
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
5.1 Visão panorâmica de mediadores imunológicos solúveis séricos em pacientes com COVID-19 grave.....	38

5.2 Visão panorâmica dos mediadores imunológicos solúveis séricos em pacientes críticos com COVID-19 de acordo com o resultado da doença.....	41
5.3 Análise de correlação integrativa e redes de mediadores imunológicos solúveis em amostras de soro de pacientes com COVID-19 grave.....	42
5.4 Linha do tempo cinética de mediadores imunológicos solúveis séricos em pacientes com COVID-19 grave.....	44
5.5 Panorama de mediadores imunológicos solúveis em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 grave.....	47
5.6 Perfil de mediadores imunes solúveis em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 grave de acordo com o desfecho da doença.....	48
5.7 Matrizes de correlação integrativa e análise de redes de mediadores imunológicos solúveis em aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 grave.....	50
5.8 Cinética de mediadores imunológicos solúveis em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 grave.....	52
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXOS I - Parecer consubstanciado do cep.....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXOS II - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....</b>	<b>74</b>

## 1.1 INTRODUÇÃO

### 1.2 SARS-CoV-2

#### 1.2.2 Etiologia e Epidemiologia do SARS-CoV-2

Em 2019, uma nova doença respiratória surgiu com sintomas similares aos da gripe, exigindo atenção das agências de saúde pública na província de Hubei, na República Popular da China. Posteriormente, após se alastrar pela província e arredores, a doença foi denominada como COVID-19, que foi associada à presença do vírus de RNA, relacionado à síndrome respiratória aguda grave ao SARS-CoV-2 (OMS, 2020; HUANG C, WANG Y, LI X, REN L, ZHAO J, HU Y, *et al.*; Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2020).

A COVID-19 tem como agente etiológico um vírus pertencente à família *Coronaviridae* com 4 gêneros, alfa-, beta-, delta- e gammacoronavirus. O SARS-CoV-2 é um novo membro do gênero betacoronavirus, causadores da Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda por coronavírus (SARS-CoV), Síndrome Respiratória do Médio Oriente (MERS-CoV), coronavírus de morcegos, como também outros identificados nos humanos e em diversas espécies animais (CARMINE CERAOLO, FEDERICO M GIORGI 2020; Zhou P, Yang XL, Wang XG, *et al.*, 2020).

Nas duas últimas décadas o SARS-CoV-2 é o terceiro Coronavírus zoonótico a surgir, e em comparação com o SARS-CoV (2003) e a síndrome respiratória do Oriente Médio MERS-CoV (2012), SARS-CoV-2 mostra um aumento da infectividade e menor taxa de letalidade. O primeiro coronavírus a causar infecções e mortes ao redor do mundo foi a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) em 2003 na China e se espalhou para 26 países com 8.098 casos confirmados e 774 mortes. Em 2012 o vírus MERS foi detectado pela primeira vez na Jordânia e na Arábia Saudita e até o início de 2018, houve 2.220 casos confirmados e 790 mortes. Dessa forma, de acordo com um grande estudo realizado pelo Centro Chinês para Controle e Prevenção de Doenças (CCDC) em 44.672 indivíduos, o número de casos fatais causado pelo novo coronavírus é de 2,3%, sendo inferior ao SARS (9,5%) e ao MERS (34,4%). Deve-se levar em consideração que esse estudo foi realizado na província de Hubei, e por isso, muitos dos participantes foram diagnosticados com um quadro clínico mais grave, devido à complexidade de diagnóstico no início da pandemia, contribuindo para o

aumento da taxa de letalidade. Dessa forma, a maioria dos indivíduos contaminados pelo SARS-CoV-2 desenvolverá sintomas leves, com características similares às de um resfriado ou gripe, porém, uma porcentagem significativa da população poderá evoluir para a forma grave da doença, que exigirá ventilação mecânica e eventualmente levará à morte (N. PETROSILLO, G. VICECONTE, O. ERGONUL, *et al.*, 2020 WORLD HEALTH ORGANIZATION 2020).

O SARS-CoV-2 é um vírus altamente transmissível e foi identificado inicialmente em dezembro de 2019 em pessoas com pneumonia grave na província de Wuhan na China. A COVID-19 é semelhante a algumas doenças zoonóticas como a gripe, incluindo também as outras variantes do SARS, como o SARS-CoV-1 e MERS, ao ponto de desenvolver sintomas como tosse, febre, dores de cabeça, diarreia e vômito, tornando ainda mais complexa a identificação clínica da COVID-19.

No final de 2019 a propagação do SARS-CoV-2 espalhou-se rapidamente para outros países, e em 11 de março de 2020 a OMS declarou o surto de COVID-19 como uma pandemia (VRISHALI S SALIAN, JESSICA A WRIGHT, PETER T VEDELL *et al.*, 2019; G. BECKER, T. MARTIN, A.N. SABO *et al.*, 2021). Uma vez estabelecida a infecção, o curso clínico do COVID-19 é variável, tornando o diagnóstico dos casos difícil (SIDDIQI e MEHRA, 2020). A infecção por SARS-CoV-2 produz, em sua maioria, casos assintomáticos ou paucissintomáticos, e algumas pessoas podem não ter qualquer manifestação clínica após a infecção por SARS-CoV-2. Foram notificados no mundo 631.228.002 casos confirmados e 6.594.587 mortes. No Brasil, foram notificados um total de 34.837.035 casos confirmados e 688.219 mortes (Figura1) (JHONSHOPKINS, 2022).



Figura 1- Mapa global de casos de COVID-19 em novembro de 2022 pelo Coronavírus. Fonte: Resource Center, Johns Hopkins University and medicine.

Diante desse cenário, tornou-se importante adotar medidas de controle através da realização de quarentena preventiva, distanciamento e o isolamento social, como importantes medidas de frearem a disseminação do vírus e também de evitar o colapso dos sistemas de saúde (Fig. 5). Essas medidas conseguem, achatando a curva de contágio, retardar a velocidade de transmissão do coronavírus, o que evita a ocorrência de muitos casos sintomáticos que demandam suporte terapêutico em um curto espaço de tempo e, conseqüentemente, reduz o número de óbitos decorrentes da doença (DAMASIO 2020; NICAS M, NAZAROFF WW, HUBBARD A *et al.*, 2010).

É importante salientar que a infecção pelo SARS-CoV-2 não se limita aos humanos podendo também infectar animais. Existem relatos pelo mundo da infecção em animais domésticos e selvagens, incluindo gatos, cães, tigres, leões, leopardos da neve, gorilas, lontras, puma, furão e veado (EI PAÍS CIÊNCIA 2020)(CARVALHO *et al.*, 2021; EPIFANIO *et al.*, 2021; FERASIN *et al.*, 2021)

### 1.2.3 Letalidade e variantes do SARS-CoV-2

Com base nos dados da pandemia obtidos pela John's Hopkins University até novembro de 2022, países como Brasil, Índia e Estados Unidos apresentaram a maior número de casos de morte em todo mundo, com taxa de letalidade de 1 a 2%. Destes

três países, o Brasil apresentou 2% de letalidade, a mais elevada destes três países (figura 2). Dos países acometidos, o Peru se destaca com a maior taxa de letalidade, com 5,2% de mortes, seguido da Indonésia (2,4%), Hungria (2,2%) e Ucrânia (2,1%). O Brasil figura a lista do quinto país com maior taxa de letalidade da COVID-19 no mundo.

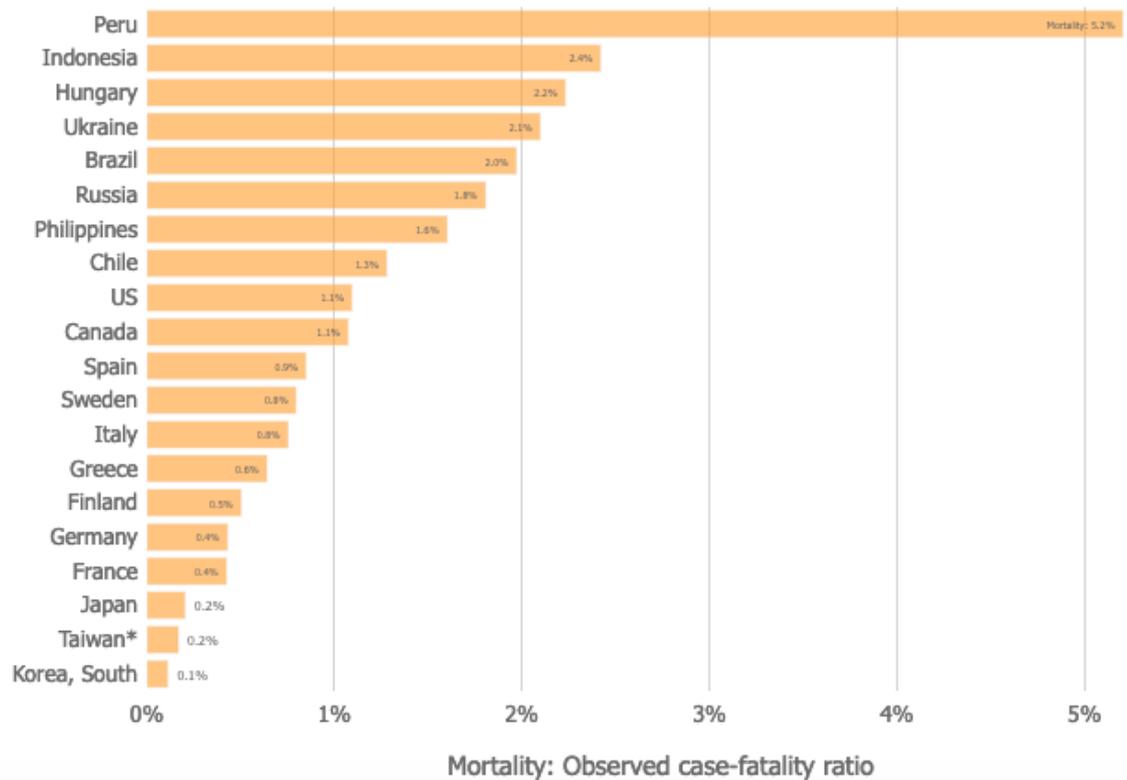


Figura 2 – Rank de casos fatais de COVID-19. Fonte: JOHNS HOPKINS, NOV 2022. Disponível em <https://coronavirus.jhu.edu/data/mortality>

Inicialmente no Brasil a pandemia foi impulsionada pelas linhagens B.1.1.28 e B.1.1.33, as quais foram prevalentes até outubro de 2020. Após esse período, destacam-se a circulação de duas variantes nacionais, P.1 e P.2, originadas da linhagem B.1.1.28. Essas duas variantes somam um total de 75% dos sequenciamentos realizados no país (WHO, 13 July 2021). O Brasil possui quatro variantes de grande potencial de disseminação B.1.1.7 (Alpha), B.1.351 (Beta), P.1 (Gamma), B.1.617.2 (Delta) e Ômicron. Além disso, foram descritas 61 linhagens de SARS-CoV-2 distribuídas nas regiões brasileiras, sendo a maioria pertencente a linhagem Gama P1(62,8%). Tal cenário é consequência da explosão dos números de novos casos e o descontrole da transmissão no país, o que possibilita a multiplicação do vírus em taxas elevadas e favorece potencialmente o surgimento de novas

variantes. Dessa forma, é fundamental a implementação e manutenção contínua de medidas efetivas de segurança como o uso de máscaras, distanciamento social e higienização dos espaços públicos, realização do diagnóstico precoce, vigilância genômica e controle da disseminação de novas variantes em território nacional, de modo a reduzir o crescimento da pandemia no Brasil e também no mundo (RENAN SOUZA, DANIEL QUEIROZ *et al.*, 2022).

Com a rápida disseminação do SARS-CoV-2 pelo mundo o surgimento de novas variantes foi inevitável. Variantes de interesse e de preocupação alastraram pelo mundo, e até o segundo semestre de 2021 foram identificadas as variantes Alfa, Beta, Gama, Delta, Ômicron, Mu e Lambda e suas respectivas mutações (Figura 2).

O início do ano de 2022 foi marcado pelo avanço da variante Ômicron pelo mundo, a qual triplicou o número de casos de COVID-19 em pelo menos 42 países, incluindo o Brasil. A situação tornou-se preocupante no país, apontando um crescimento de 300% no número de casos. Segundo o BUTANTAN, tal cenário não foi pior, pois a cobertura vacinal no país conteve o crescimento do número de óbitos na mesma proporção do aumento dos novos casos (BUTANTAN, 13/01/2022).

<b>VARIANTES DE INTERESSE</b>	<b>LINHAGEM</b>	<b>PRIMEIRA DETECÇÃO</b>	<b>DATA DA AMOSTRA</b>	
Epsilon	20C/S.452 R	B.1.427/ B.1.429	Estados Unidos da América	jun/20
Zeta	20B/S.484 K	B.1.1.28.2	Brasil	abr/20
Eta	20A/S484 K	B.1.525	Múltiplos países	dez/20
Teta	20B/S:265 C	B.1.1.28.3 conhecida como P.3	Filipinas e Japão	fev/21
Iota	20C/S:484 K	B.1.526	Estados Unidos da América	nov/20
Kapa	21A/S:154 K	B.1.617.1	Índia	out/20
Lambda	21G	C.37	Peru	dez/20
<b>VARIANTES DE PREOCUPAÇÃO</b>	<b>LINHAGEM</b>	<b>PRIMEIRA DETECÇÃO</b>	<b>DATA DA AMOSTRA</b>	
Alfa	20J/501Y. V1	B.1.1.7	Reino Unido	set/20
Beta	20H/501Y. V2	B.1.351	África do Sul	ago/20
Gama	20J/501Y. V3	B.1.1.28.1	Brasil e Japão	dez/20
Delta	21A/S:478 K	B.1.617.2	Índia	out/20

Figura 3 – Variantes de interesse (VOI) e variantes de preocupação (VOC) do SARS-CoV-2. Fonte: WHO, 13 July 2021; adaptado.

Os VOCs mais recentes substituíram em grande parte outras variantes co-circulantes do SARS-CoV-2. Delta alcançou quase 90% de todas as sequências virais submetidas ao GISAID até outubro de 2021, e mais recentemente, a variante Ômicron é atualmente a variante dominante circulando globalmente, respondendo por >98% das sequências virais compartilhadas após fevereiro de 2022. Como a transmissão da Ômicron foi sustentada, isso levou a uma evolução intra-variante significativa, gerando várias sub-variantes da Ômicron. Desde a sua designação como VOC pela OMS em 26 de novembro de 2021, os vírus que fazem parte do complexo Ômicron continuaram a evoluir, levando a linhagens descendentes com diferentes constelações genéticas de mutações. Cada constelação pode ou não diferir no risco à saúde pública que representa, e cada linhagem que inclui substituições em locais-chave pode precisar de mais investigação para avaliar se suas características divergem ou não daquelas que definem a variante de preocupação de onde provêm (OMS, 2022, disponível em <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>). Em outubro de 2022, as sublinhagens de BA-5 (BF.7, BF.14, BQ.1, BQ.1.1) tem ganhado destaque, em

especial BQ1.1, com aumento do número de casos em todo mundo (OMS, 2022) e no Brasil (MINISTÉRIO DA SAUDE, BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO ESPECIAL: COVID-19, Outubro de 2022).

#### 1.2.4 Transmissão

A rápida disseminação do SARS-CoV-2 a nível global, deve-se a sua alta transmissibilidade, sendo transportado por microgotículas de saliva de indivíduos infectados sintomáticos ou assintomáticos. Esses indivíduos ao tossir, falar ou espirrar podem liberar essas microgotículas, quando aerossolizadas, podem se espalhar por longas distâncias podendo entrar em contato direto com a via aérea e olhos de outros indivíduos. Essas partículas virais podem contaminar superfícies que atuam como fômites, quando em contato com as mãos dos indivíduos que acidentalmente carregam os vírus para a boca, nariz ou olhos. A transmissão assintomática e pré-sintomática já foi descrita e para aqueles que se tornam sintomáticos, o período de incubação é de 4 a 5 dias em média (Li S, JIANG L, LI X, LIN F, WANG Y, LI B, *et al.*, 2020).

De modo geral, a taxa de transmissão do vírus pode mudar de uma variante para outra, preferencialmente, a taxa de transmissão pode variar entre as diferentes variantes. Um estudo recente publicado pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), em parceria com o Instituto de Química (IQ-USP) e o Hospital Sírio Libanês mostrou que o novo Coronavírus é ainda mais mutável do que se discutia durante o auge da pandemia. Sabe-se que a maior parte das mutações estão relacionadas com alterações na proteína S(Spike) do vírus, especialmente na região N Terminal (NTD) da proteína. Isso ocorre, pois o sistema imune, especialmente anticorpos neutralizantes anti-spike, oferecem continuamente impedimento para a interação do SARS-CoV-2 e a enzima conversora da angiotensina 2(ACE2) reduzindo o processo de infecção viral. Dessa forma, as mutações tornam-se uma forma de escape do vírus perante a pressão seletiva do sistema imune, burlando essa inibição e modificando a região de interação do vírus (RBD) com a célula humana (HE B, WANG J, WANG Y *et al.*, 2020; SIMONE BRANDÃO, EMANUELLE GODOI, JULIA RAMOS *et al.*, 2020).

Para diminuir a transmissão e o surgimento de novas variantes pelo novo Coronavírus e é de suma importância a utilização de máscaras cobrindo completamente a boca e nariz, correta higienização das mãos e evitar circular nas

ruas e/ou em ambientes com grande concentração de pessoas, além da adequada descontaminação em locais e objetos com potencial de contaminação (OMS, 2020; LIPPI G, PLEBANI, M *et al.*, 2020).

### 1.2.5 Ciclo de multiplicação do SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de sentido positivo com um tamanho de genoma de 29.903 nucleotídeos. A maior parte de seu genoma codifica para ORF1ab (~ 72%), que está envolvido em replicação e patogênese, enquanto outras ORFs codificam proteínas estruturais (Spike (S), Envelope (E), Glicoproteína de membrana (M) e Nucleocapsídeo (N) (Figura 4) (CHRISTIAN LUKE D C BADUA, KAROL ANN T BALDO, PAUL MARK B MEDINA, 2020).

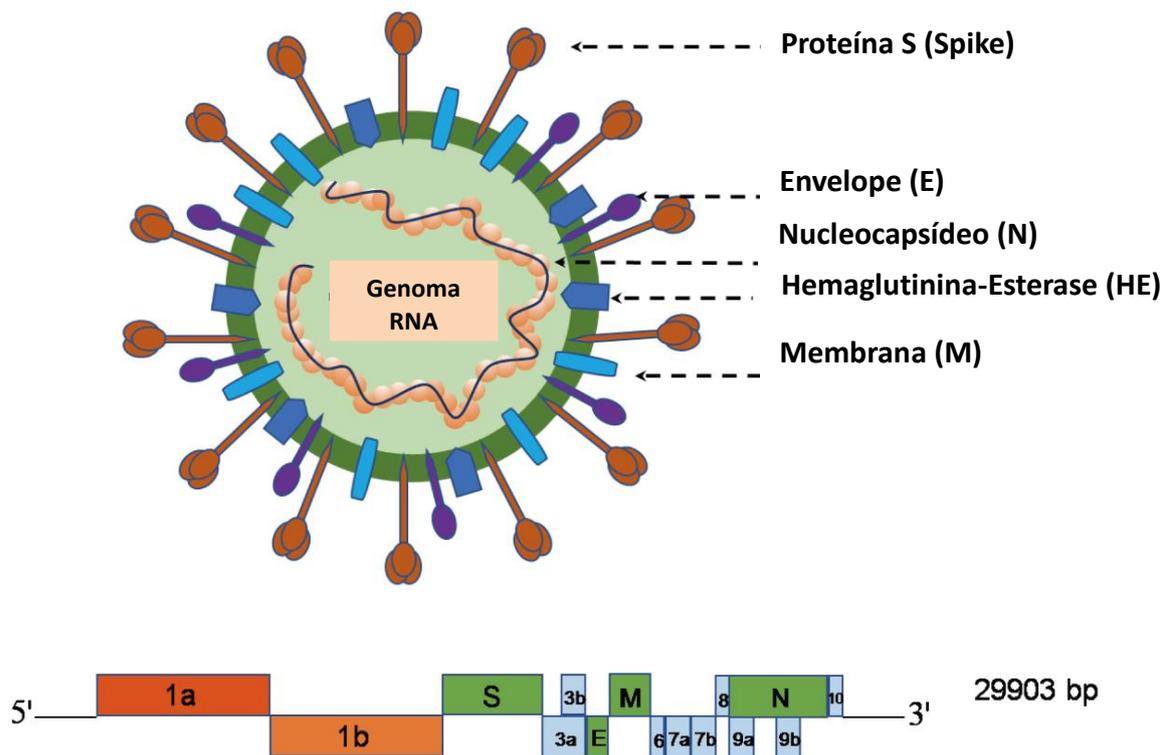


Figura 4 – Representação esquemática da partícula viral e do genoma SARS-CoV-2. Fonte: JIN Y, *et al.*, 2020; adaptado.

O ciclo do SARS-CoV-2 (Figura 4) inicia-se com a interação da glicoproteína Spike (proteína S) com o receptor celular ACE2 presentes nas células alvo. A ACE2 é uma proteína de membrana tipo I expressa principalmente nos pulmões, coração,

rins e intestino, e o aumento da sua expressão está associado a doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade e hipertensão (GUO, Y. R., CAO *et al* 2019).

A glicoproteína Spike é responsável pela característica conformacional em coroa da família *Coronaviridae*, estando essa localizada no envelope viral. A ligação entre a glicoproteína Spike e a ECA2 está relacionada ao tropismo do SARS-CoV-2 pelas células alvo presentes no hospedeiro, contribuindo para a adesão do vírus às células. O processo de entrada do SARS-CoV-2 é altamente regulada e não garante a entrada do vírus na célula alvo de forma independente, e por isso, a glicoproteína S precisa ser ativada por clivagem proteolítica entre as subunidades S1/S2, catalisada pela Furina, Catepsina L e a serino protease transmembrana tipo II (TMPRSS2), para que ocorra mudança conformacional em sua subunidade S2, e permita a interação do domínio RBD com o receptor ECA2 e consequente penetração viral na célula hospedeira (SHANG, J., WAN, Y., LUO C, *et al.*, 2020; YANG, X.L., WANG, X.G, *et al.*, 2020).

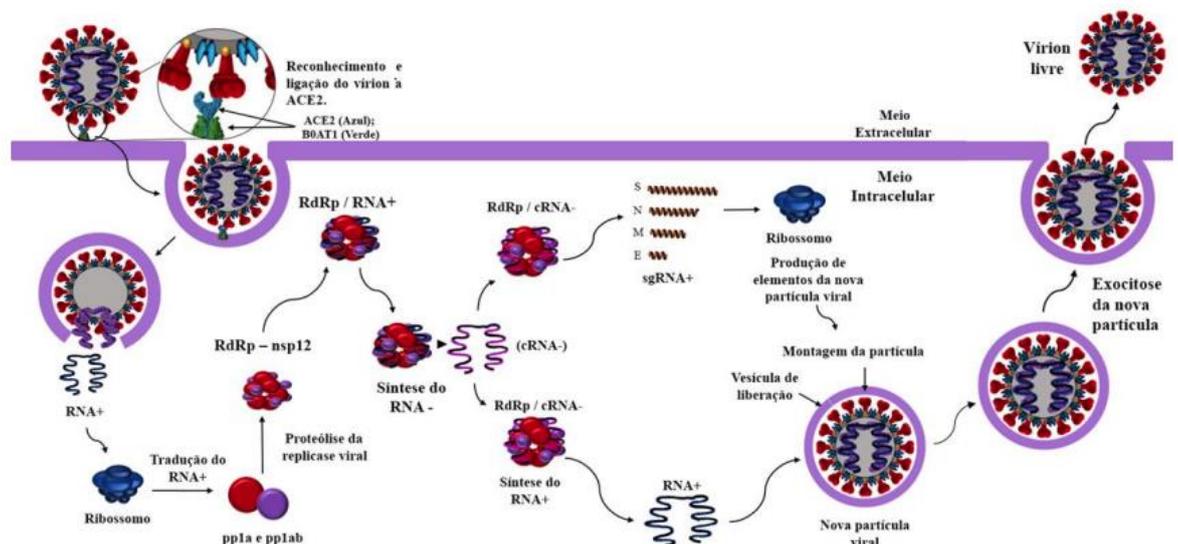


Figura 5 – Ciclo de multiplicação do SARS-CoV-2. Fonte: MUDI, v. 25, n. 1, p. 73 - 90, 2021.

A ligação entre a glicoproteína S e a ECA2 é responsável pelo tropismo do vírus pela célula hospedeira, com isso, células que possuem esse receptor em sua superfície são propensas a infecção pelo SARS-CoV-2. Por se tratar de um vírus altamente mutagênico, as alterações conformacionais nas proteínas S são frequentes, podendo dessa forma, burlar as principais barreiras do sistema imune, até mesmo em pessoas vacinadas contra a COVID. Com o aumento do número de pessoas

vacinadas e reinfectadas pelo SARS-CoV-2, a tendencia é de ocorrer novas mutações do vírus que possam evadir o sistema imune, possibilitando o surgimento de variantes com potencial de infecção e propagação maiores como é o caso da variante Ômicron. Segundo estudos de sequenciamento, 10 a 12 mutações que geraram essa variante ocorreram na proteína S, possibilitando que essa nova versão do SARS-CoV-2 infecte pessoas vacinadas e anteriormente infectadas (DONOGHUE Mary; Hsieh Frank; BARONAS Elizabeth *et al.*, 2020; SHEREEN, M. A.; KHAN, S. *et al.*, 2020).

#### **1.2.6 Curso clínico, Biomarcadores e Imunologia da infecção pelo SARS-CoV-2**

A COVID-19 é uma doença muito heterogênea com manifestações clínicas e morfológicas variadas de diferentes perfis moleculares. Além disso, é notório que o perfil clínico do hospedeiro é um ponto chave para o desenvolvimento da sua forma grave (YA-DONG GAO, MEI DING, XIANG DONG *et al.*, 2020; WIERSINGA *et al.*, 2020). Dessa forma, fatores como sexo, obesidade, tabagismo, condições crônicas e outras comorbidades como a hipertensão e o diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares, condições respiratórias subjacentes e câncer, apresentam maior risco para essas complicações graves e morte (LI Q, GUAN X, WU P *et al.*, 2020; WHO, JONATHAN A C, *et al.*, 2020). A COVID-19 pode ser dividida em 3 estágios que incluem uma fase de resposta viral e uma fase de resposta inflamatória, onde cada fase possui sintomas e sinais clínicos específicos (Figura 6) (SIDDIQI e MEHRA, 2020).

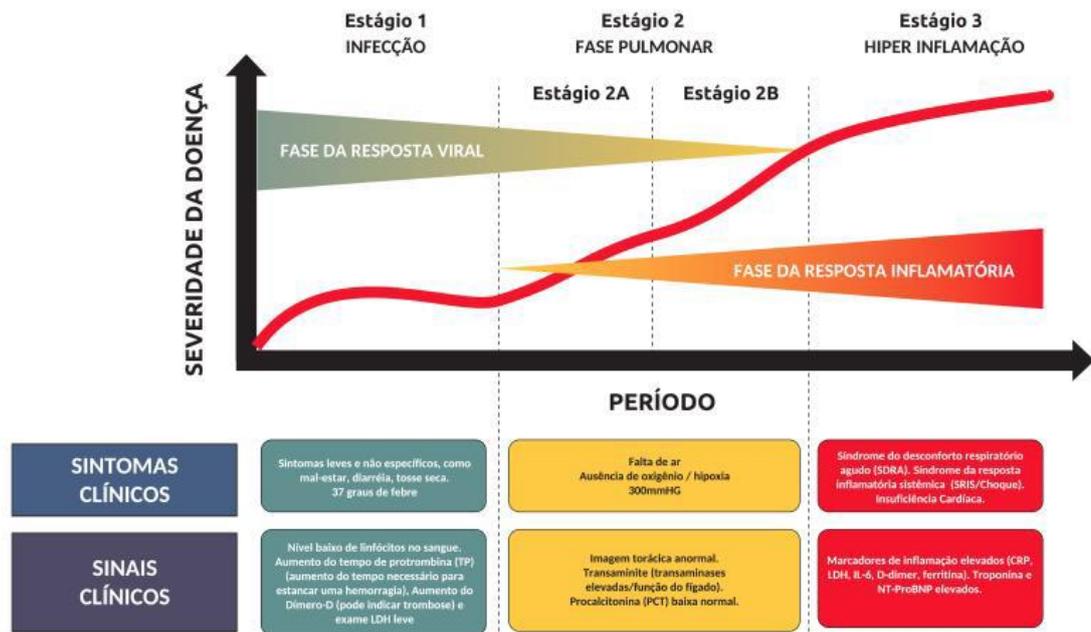


Figura 6 – Curso clínico da COVID-19 e estágios de progressão da doença com sinais e sintomas clínicos. Fonte: Adaptado de Siddiqi e Mehra, 2020.

É importante acrescentar que diversas atitudes são de extrema importância no controle da disseminação do vírus e da própria doença, como fortalecer o organismo por meio de boa alimentação, sono regular e exposição ao sol da manhã, além de outros hábitos saudáveis como atividades físicas e não consumo de bebidas alcoólicas e drogas afins, pois o consumo pode diminuir a eficácia do sistema imunológico, atingindo as células imunes e enfraquecendo o reconhecimento e combate ao vírus (HUANG C, WANG Y, LI X., *et al* 2019).

Ainda não está claro por que alguns pacientes com COVID-19 são assintomáticos ou só desenvolvem sintomas leves, enquanto outros evoluem para a forma grave da doença. Além disso, é pouco conhecido o motivo pelo qual alguns pacientes com a forma grave sobrevivem, enquanto outros sucumbem à morte. Observa-se nos pacientes com COVID-19 uma resposta inflamatória aguda aumentada, na qual mediadores como proteína C reativa, dímero D e troponina são abundantes em amostras de soro de pacientes. Um aumento notável de citocinas e quimiocinas inflamatórias é observado durante a infecção, no entanto, o papel desses biomarcadores contra o SARS-CoV-2 não é claramente descrito. Alguns estudos apontam que o aumento da concentração sérica desses biomarcadores pode causar uma síndrome de tempestade de citocinas desordenada que contribui para

hiperinflamação, falência em múltiplos órgãos e patogênese (PUJA MEHTA & DAVID FAJGENBAUM, 2021; FAJGENBAUM & JUNE 2020; JOSE RJ & MANUEL A, 2020).

Nesse sentido, as abordagens terapêuticas sob investigação têm como alvo o aumento da liberação de citocinas utilizando anticorpos anti-citocinas ou imunomoduladores, deve-se considerar uma manutenção equilibrada e uma resposta inflamatória adequada para a eliminação de patógenos (JOSE & MANUEL, 2020). Em uma avaliação abrangente do lavado broncoalveolar de pacientes com Influenza sazonal moderada e grave e COVID-19 grave revelou que o compartimento pulmonar é composto por uma superprodução robusta de resposta pró-inflamatória imediata com a presença de IL-6, IP-10, MCP-1 e CXCL8, TNF e IL-1 $\beta$  (REYNOLDS D, VAZQUEZ C *et al.*, 2021). Essas citocinas estão associadas a um risco aumentado de hiperpermeabilidade vascular, falência de múltiplos órgãos e, eventualmente evolução para quadros de exaustão celular e morte, quando as altas concentrações de citocinas não diminuem ao longo do tempo (MEDURI *et al.*, 1995). Nesse contexto, é muito importante estudar o ambiente pulmonar e as vias aéreas superiores durante a infecção pelo SARS-CoV-2, sendo essencial para analisar o desfecho do microambiente local no meio respiratório para entender a ativação imunológica descontrolada e a inflamação durante a COVID-19 (HENDERSON LA *et al.*, 2020; XU *et al.*, 2020).

De modo geral, o sistema imune em contato com patógenos desenvolve mecanismos de defesa que inicialmente são comandadas pela resposta imune inata e outra mais tardia, mediada pela imunidade adquirida. A infecção pelo SARS-CoV-2 é rápida e intensa. Foi abordado em alguns estudos que a infecção pelo novo coronavírus em alguns indivíduos é marcada pela inibição da produção do IFN- $\gamma$ , acarretando uma disseminação mais rápida do vírus, com consequente aumento da carga viral que proporciona uma maior transmissibilidade, além de aumentar a transmissibilidade do vírus para outros indivíduos (ABBAS A, LICHTMAN A, PILLAI S *et al.*, 2021).

Essa elevada carga viral favorece a descompensação/desregulação do sistema imune e no descontrole da produção de citocinas, quimiocinas, e fatores de crescimento (RAGAB D, HAITHAM E *et al.*, 2020). Essa desregulação contribui para o aumento de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  (Figura 7). Essa hiperinflamação secundária à infecção por COVID-19, está frequentemente associada a um pior prognóstico. Formas mais graves são observadas nesse caso, provocando

alterações fisiológicas e contribuindo para o surgimento de patologias nos órgãos infectados, em especial o pulmão (ANA ALBURQUERQUE *et al.*, 2021; FAJGENBAUM & JUNE, 2020).

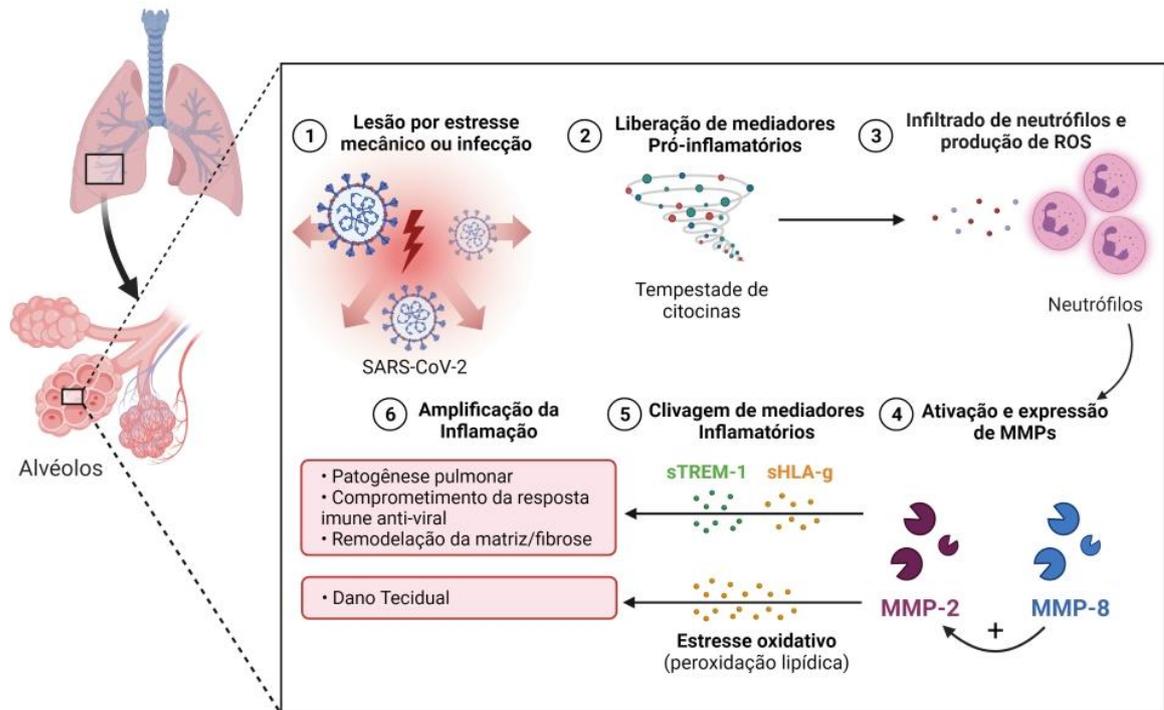


Figura 7. Hiperinflamação e dano alveolar. MMPs como componentes cruciais dos processos que levam à pneumonia e ao agravamento dos casos da COVID-19. Fonte: CARLOS SORGI, USP 2021.

Para evidenciar esse fenômeno, um estudo realizado por Han e colaboradores (2020) determinaram o perfil de citocinas séricas em pacientes com COVID-19. Observou-se que alguns pacientes tinham níveis séricos elevados das citocinas: TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10. Porém, os níveis de IL-6 e IL-10 foram significativamente maiores nos pacientes com COVID-19 grave, quando comparado com os níveis encontrados em pacientes com COVID-19 leve e moderada. Portanto, os níveis de IL-6 e IL-10 podem ser considerados como preditores de gravidade da doença, e sua dosagem podem auxiliar no monitoramento de gravidade dos pacientes de maior risco (LIESL HAGAN, MPH DAVID W. MCCORMICK *et al.*, 2021).

Durante a pandemia de COVID-19, utilizou-se muito o termo tempestade de citocinas, do inglês *cytokine storm*, de modo a definir a resposta inflamatória exacerbada provocada pela infecção pelo SARS-CoV-2. Esse fenômeno é marcado principalmente pela replicação viral aumentada, da evasão viral do sistema

imunológico, além do desenvolvimento de resposta inflamatória aguda exacerbada (LIESL HAGAN, MPH DAVID W. MCCORMICK *et al.*, 2020).

Essa resposta imune está relacionada com a formação da tempestade de citocinas e comprometimento da resposta imune antiviral, remodelação da matriz celular/fibrose e consequente disfunção de múltiplos órgãos, tendo ênfase na patogênese pulmonar, além de estar relacionada a pacientes mais graves. A resposta imune na tentativa de combater o vírus provoca a hiperestimulação de suas células de defesa, causando uma tempestade de citocinas pró-inflamatórias e hiperinflamação, principalmente pelo aumento de citocinas de caráter pro-inflamatório como a IL-6 e a redução de citocinas reguladoras como IL-10 (ANA ALBURQUERQUE *et al.*, 2021; SOY *et al.*, 2020). A hiperestimulação das células NK e células dendríticas amplificam ainda mais a produção de IL-12, que por sua vez amplificam a ativação dos macrófagos, aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias. A pandemia causada pelo novo Coronavírus colocou em evidência a forma como uma resposta imunológica descontrolada pode inflamar e danificar os tecidos de órgãos afetados pelo SARS-CoV-2 agravando a doença e podendo levar o paciente a óbito (HU *et al.*, 2020).

Essa hiperinflamação é agravada em pessoas com desregulação metabólica, fenômeno presente em pessoas com excesso de gordura ou indivíduos com diabetes descompensada. Pessoas obesas tem maiores riscos de evoluírem para casos graves da doença uma vez que o tecido adiposo é preenchido por várias células imunes, incluindo células T e macrófagos, aumentando a inflamação e reduzindo a resposta e eficácia dos antivirais (Hu *et al.*, 2020). Com isso, esse excesso de gordura promove a inflamação sistêmica, caracterizada pela infiltração e ativação de células imunes que secretam mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, que secretam moléculas pró-inflamatórias, uma vez que o tecido adiposo é rico em células neutrófilos, células B1 e B2, células NK (PHILIPPI MAFFETOBNE, PAUL LAUSEN 2020).

### 1.2.7 Diagnóstico para COVID-19

Considerando a permanência de circulação do SARS-CoV-2, torna-se de extrema importância utilizar metodologias diagnósticas para auxiliar na detecção do vírus, como também para frear a sua dispersão, além de fornecer um panorama da disseminação da doença (DAMASIO, 2020). O diagnóstico precoce da doença é uma ferramenta importante para evitar o colapso do sistema público de saúde, além de possibilitar um suporte médico ao paciente em tempo hábil, evitando dessa forma maiores danos à saúde. O quadro clínico inicial do paciente que na maioria das vezes é caracterizado como síndrome gripal não é suficiente para fechar o diagnóstico de COVID-19, sendo necessário a investigação clínico-epidemiológica, anamnese e exame físico adequado do paciente, além de considerar o histórico de contato próximo ou domiciliar nos 14 dias anteriores ao aparecimento dos sinais e sintomas com pessoas já confirmadas para COVID-19 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

A detecção da infecção pelo SARS-CoV-2 especialmente por meio da detecção do genoma viral é primordial para o diagnóstico da COVID-19. Entre os métodos diagnósticos laboratoriais mais utilizados é importante ressaltar o teste de Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa qualitativa (RT-PCR) e quantitativa (RT-qPCR) para a detecção do gene N e do gene da RNA polimerase dependente de RNA do vírus. Além disso, pode-se encontrar testes para detecção de antígeno N ou anticorpos IgA, IgM e IgG por LFIA (imunoensaio de fluxo lateral-imunocromatográfico), CLIA (imunoensaio de quimiluminescência), CMIA (imunoensaio de micropartículas de quimiluminescência), ECLIA (imunoensaio de eletroquimiluminescência). Os exames de imagem do tipo Raio X e tomografia computadorizada de alta resolução – TCAR tem sido utilizados para avaliar dano pulmonar em pacientes com COVID-19 (YI-WEI TANG, A JONATHAN E, SCHMITZ, *et al.*, 2020).

### 1.2.8 Sorologia

A detecção de anticorpos contra o SARS-Cov-2 tem sido bastante utilizado no controle de pessoas infectadas durante a pandemia e a pesquisa de anticorpos das classes IgA, IgM e IgG tem se mostrado eficazes. Alguns estudos mostraram que a detecção de anticorpos IgA, parece ser mais sensível se comparada ao IgM em casos

de COVID-19, com 92.7% e 85.4% de positividade, respectivamente. A detecção na fase aguda de anticorpos IgA e IgM se dá em média no 5º dia após o início dos sintomas, enquanto a detecção de anticorpos IgG ocorre aproximadamente com 10-18 dias após o início dos sintomas e possui uma positividade de 67-78% (SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE 2020; JOURNAL OF INFECTION CONTROL 2020).

Uma alternativa para detecção de anticorpos IgG e IgM no apoio diagnóstico para COVID-19 são os testes rápidos (teste Imunocromatográfico). Esses testes possuem sensibilidade e especificidade que podem variar de acordo com o fabricante. Um estudo realizado pelo pesquisador Flávia Martinello da Universidade Federal de Santa Catarina mostrou que a acurácia desses testes pode variar muito de acordo com ensaio, fabricante e o período da coleta da amostra. Foi observado uma variação de mais de 40% da sensibilidade e especificidade entre as marcas testadas (SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE 2020; JOURNAL OF INFECTION CONTROL 2020).

### **1.2.9 RT-qPCR**

O diagnóstico padrão ouro para identificação do vírus SARS-CoV-2 no diagnóstico de COVID-19 é o RT-qPCR, sendo um teste com excelente especificidade. Trata-se de um teste realizado por meio das técnicas de reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa e amplificação em tempo real, além do sequenciamento parcial ou total do genoma viral. As amostras para esta análise podem ser obtidas por meio do aspirado nasofaríngeo (ANF), swab nasal e oral, bem como pela secreção respiratória do trato inferior, como escarro, lavado traqueal ou lavado broncoalveolar. Recomenda-se a aplicação desse teste entre o 1º ao 10º dia de sintomas ou em indivíduos que tiveram exposição recente com a pessoa infectada dentro desse período (OMS 2021).

## 2 JUSTIFICATIVA

A COVID-19 representa um dos maiores desafios do século 21 e ainda deixa várias lacunas sobre como alguns indivíduos evoluem para alta enquanto outros progridem para quadros mais graves e óbito após ventilação mecânica. O conhecimento da resposta imunológica sistêmica do hospedeiro durante condições de origem infecciosa é essencial para o entendimento dos mecanismos de doença que possam explicar este fenômeno, bem como para fornecer subsídios para a busca de estratégias de prevenção, controle, terapêutica e acompanhamento das infecções.

A COVID-19 vêm sendo marcada principalmente por aumento de procalcitonina (PCT), proteína C-reativa (CRP), ferritina sérica, IL-2R, IL-6, IL-8, IL-10, TNF, leucopenia e linfocitopenia (HOU *et al.*, 2020; CHU *et al.* 2020). Além disso, comprometimento hemostático, caracterizado por aumento de D-dímero, produtos de degradação da fibrina (FDP), acompanhado de trombocitopenia e parece contribuir para a patogênese da doença (BIKDELI *et al.* 2020; HOU *et al.* 2020). No entanto, ainda não se sabe se essas alterações hemostáticas são um efeito específico da infecção por SARS-CoV-2 ou são uma consequência do “cytokine storm” que precipita o início da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), como observado em outras doenças virais. Outro questionamento é se o perfil imunológico sistêmico está associado e reflete o microambiente no compartimento pulmonar.

Apesar destes achados, ainda são escassos os biomarcadores de prognóstico para o acompanhamento de pacientes COVID-19 e o conhecimento dos aspectos imunológicos durante a fase aguda de resposta viral e da fase de resposta inflamatória ainda estão sobre escrutínio. Assim, a presente proposta busca contribuir para o entendimento de mediadores solúveis em pacientes com COVID-19 de acordo com o perfil dos biomarcadores em diferentes tempos de coleta, sendo a primeira coleta no tempo D0 (admissão), D2-6, D7, D8-13 e D14. Podendo assim, avaliar o perfil de quimiocinas, citocinas pro-inflamatórias/reguladoras e fatores de crescimento celular.

Nesse projeto, serão abordadas duas hipóteses principais: 1) relação de alta/óbito com o aumento/redução de mediadores solúveis e a possível relação do processo de exaustão celular e óbito; 2) se o perfil de biomarcadores no aspirado traqueal assemelha-se ao observado no soro; 3) o aumento/redução de um biomarcador no soro/aspirado tem relação direta com a melhora ou piora clínica do paciente.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar mediadores solúveis em amostras de soro e aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 internados em Centro de Terapia Intensiva à luz do desfecho clínico

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Quantificar os níveis de quimiocinas, citocinas pro-inflamatórias/reguladoras e fatores de crescimento celular no soro e no aspirado traqueal de pacientes com COVID-19;

Avaliar o perfil de mediadores imunológicos solúveis em diferentes tempos (D0, D2-6, D7, D8-13 e D14) no soro e no aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 internados em Centro de Terapia Intensiva;

Contrastar os níveis basais de quimiocinas, citocinas pro-inflamatórias/reguladoras e fatores de crescimento celular no soro e no aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 com desfechos clínicos distintos: alta e óbito;

Estabelecer assinaturas e redes integrativas de correlações de biomarcadores por meio de análises multiparamétricas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 População do estudo

Neste estudo para a obtenção da amostra pulmonar utilizamos a técnica de aspirado traqueal por ser uma técnica menos invasiva para o paciente, se comparada a técnica de lavado broncoalveolar. No aspirado traqueal é utilizada a própria pressão de vácuo do equipamento para obtenção da secreção pulmonar, sem precisar estilar soro no paciente ou utilizar outras ferramentas como broncoscópio para a obtenção da amostra.

Esta investigação observacional transversal foi composta por uma amostra de conveniência incluindo 675 espécimes biológicos (soro e aspirado traqueal) de pacientes COVID-19 criticamente enfermos internados em unidade de terapia intensiva (UTI) e controles, com o objetivo de analisar a resposta imune compartimentalizada sistêmica e das vias aéreas.

Os pacientes com COVID-19 foram admitidos na UTI do Hospital Risoleta Tolentino Neves (Belo Horizonte, MG) e do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto, SP). O diagnóstico de COVID-19 foi confirmado por RT-PCR positivo para SARS-CoV-2 visando o gene E. Um compêndio detalhado da população e métodos do estudo é apresentado na Figura 8.

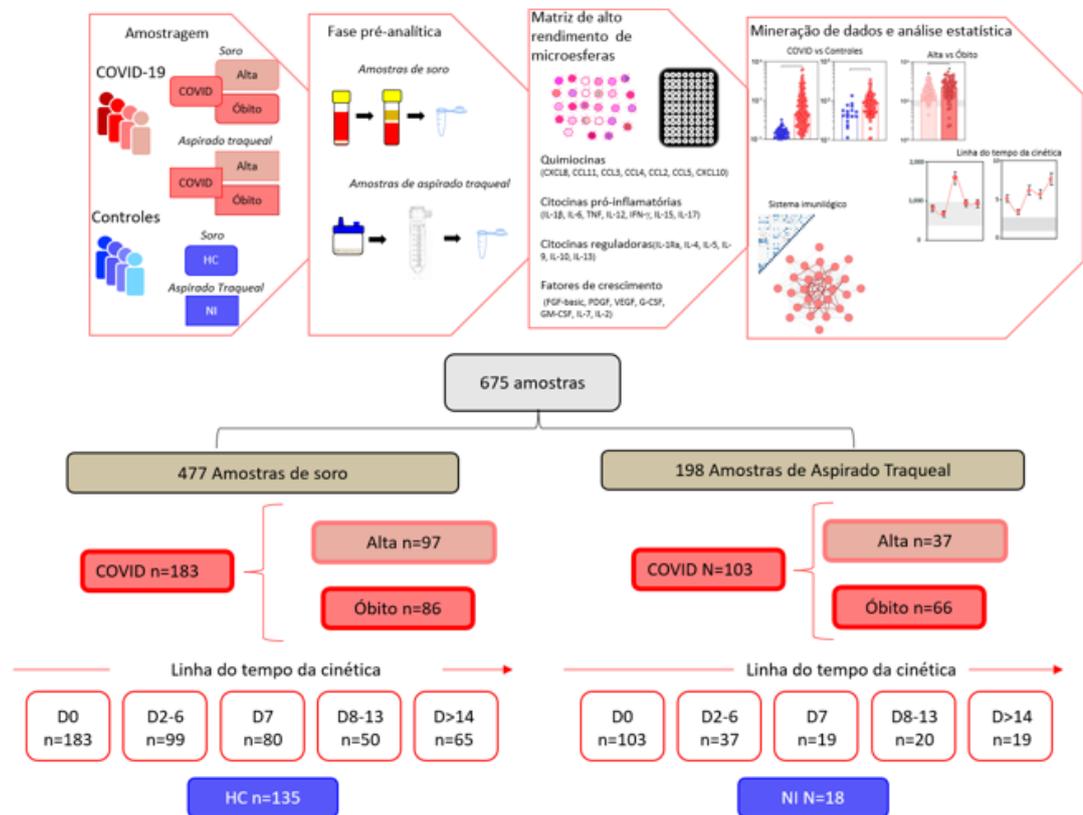


Figura 8- Resumo da população de estudo e métodos. Uma visão geral da amostragem, etapas pré-analíticas, análise de alto rendimento de células imunes, mediadores solúveis, mineração de dados e análise estatística são fornecidos nos painéis superiores. Esta investigação compreendeu um estudo transversal incluindo 675 espécimes humanos (477 amostras de soro e 198 amostras de aspirado traqueal) de pacientes com COVID-19 grave (“COVID”), amostras de soro de controles saudáveis pré-pandemia (HC) e aspirados de pacientes não infectados (NI) sob ventilação mecânica na UTI. Avaliando a resposta imune sistêmica, o grupo “COVID” compreendeu 477 amostras de 183 pacientes com COVID-19 (72 mulheres e 111 homens - faixa etária entre 18-90 anos, idade (mediana de 65 anos), obtida em cinco momentos consecutivos (Dias = D), incluindo: D0 (n=183), D2-6 (n=99), D7 (n=80), D8-13 (n=50) e D>14-36 (n=65) após a admissão na UTI. O grupo “COVID” foi ainda categorizado de acordo com o desfecho da doença: alta (n=97) ou óbito (n=86). O grupo controle foi composto por 135 amostras de soro de controles saudáveis pré-pandêmicos pareados por idade, referidos como: grupo “HC”. Para avaliar a resposta imune compartimentada das vias aéreas, o grupo “COVID” foi composto por 198 amostras de aspirado traqueal (AT) de 103 pacientes com COVID-19 (39 mulheres e 64 homens – faixa etária de 18 a 90 anos, idade mediana de 64 anos), coletados em cinco pontos de tempo consecutivos (Dias = D), incluindo: D0 (n=103), D2-6 (n=37), D7 (n=19), D8-13 (n=20) e D>14 (n=19) após admissão na UTI. O grupo “COVID” foi categorizada ainda de acordo com o desfecho da

doença, referida como: “Alta” (n=37) ou “Óbito” (n=66). O grupo controle foi composto por 18 pacientes não infectados sob ventilação mecânica por trauma ou queimadura, todos apresentando diagnóstico negativo de Infecção por SARS-CoV-2 por RT-PCR, referido como grupo “NI”.

Para avaliação da resposta imune sistêmica, o grupo “COVID” foi composto por 477 amostras de soro de 183 pacientes com COVID-19 (72 mulheres e 111 homens – faixa etária de 18 a 90 anos, idade mediana de 65 anos), obtidas em cinco pontos de tempo consecutivos (Dias = D), incluindo: D0 (n=183), D2-6 (n=99), D7 (n=80), D8-13 (n=50) e D>14 (n= 65) após admissão na UTI. O grupo “COVID” foi ainda classificado de acordo com o desfecho da doença e referido como: “Alta” (n=97) ou “Óbito” (n=86). As amostras de soro foram coletadas em tubos contendo gel e na ausência de anticoagulante por punção venosa na rotina matinal de visita à UTI, aliqüotadas e armazenadas a -80°C até o processamento. O grupo controle foi composto por 135 amostras de soro de controles saudáveis pré-pandemia pareados por idade denominados: grupo “HC” (70 mulheres e 65 homens – faixa etária de 18 a 90 anos, idade mediana de 65 anos). As amostras de soro foram obtidas de um biorepositório mantido a -80°C no Instituto René Rachou (FIOCRUZ-Minas).

Para avaliar a resposta imune compartimentalizada das vias aéreas, o grupo “COVID” foi composto por 198 amostras de aspirado traqueal (AT) de 103 pacientes com COVID-19 (39 mulheres e 64 homens – faixa etária de 18 a 90 anos, idade mediana de 64 anos), coletados em cinco momentos consecutivos (Dias = D), incluindo: D0 (n=103), D2-6 (n=37), D7 (n=19), D8-13 (n=20) e D>14 (n=19) após admissão na UTI. O grupo “COVID” foi ainda categorizado de acordo com o desfecho da doença, referido como: “Alta” (n=37) ou “Óbito” (n=66). O grupo controle foi composto por 18 pacientes não infectados (RN) sob ventilação mecânica (5 mulheres e 13 homens – faixa etária de 18 a 90 anos, idade mediana de 53 anos) por trauma ou queimadura, todos com resultado negativo diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 por RT-PCR. Amostras de AT (2-5mL) foram coletadas por aspiração em coletores de secreção traqueal estéreis na visita de rotina dos pacientes no início da manhã para limpeza das vias aéreas. Apenas a secreção produtiva foi incluída neste estudo.

As amostras de AT foram imediatamente transferidas para um laboratório de biossegurança nível 3, aliqüotadas e armazenadas a -80°C até o processamento. O protocolo do estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto René Rachou/FIOCRUZ-Minas (CAAE: 42560721.7.0000.5091) e Hospital das Clínicas da

Universidade de São Paulo/USP-RP (CAAE: 30816620.0.0000.5440). Esta investigação seguiu os princípios da declaração de Helsinque, bem como a resolução nº 466/2012 do Ministério da Saúde do Brasil para pesquisas envolvendo seres humanos. O consentimento informado foi obtido de todos os participantes ou de seus familiares antes da inclusão na presente investigação.

#### **4.2 Preparação de soro e aspirado traqueal**

Alíquotas de amostra de soro foram descongeladas a 37°C, centrifugadas a 24.000 x g para remover a camada lipídica e detritos grandes e o sobrenadante filtrado através de um filtro de seringa de 0,45µm para maximizar ainda mais a remoção de detritos. Alíquotas de aspirado traqueal (TA) foram descongeladas a 37°C, diluídas em 1:2 em solução salina tamponada com fosfato (PBS) filtrada através de filtros celulares (70µm) em tubos de polipropileno para remover aglomerados de muco e agregados celulares. As amostras foram ainda centrifugadas a 24.000 x g para remover detritos grandes e o sobrenadante filtrado através de um filtro de seringa de 0,45µm para maximizar ainda mais a remoção de detritos. As amostras de soro e TA pré-filtradas foram mantidas em gelo até o uso na matriz de microesferas de alto rendimento.

#### **4.3 Avaliação de mediadores imunológicos solúveis em amostras de soro e aspirado traqueal**

Os níveis de mediadores imunológicos solúveis foram medidos em amostras de soro de pacientes com COVID-19 (COVID), controles saudáveis pré-pandêmicos (HC) pareados por idade, bem como em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 (COVID) e não infectados pacientes (NI) por matriz de microesferas de alto rendimento (Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Uma variedade de mediadores imunológicos foi quantificada, incluindo: quimiocinas (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL5, CCL4, CCL2 e CXCL10), citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, IL-6, TNF, IL-12, IFN-γ, IL-15 e IL-17), citocinas reguladoras (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) e fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF,

GM-CSF, IL-7 e IL-2). Os resultados foram expressos em pg/mL de acordo com curvas padrão para cada mediador imunológico usando uma análise de ajuste logístico do quinto parâmetro.

#### **4.4 Mineração de dados e análise estatística**

Todas as análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism, versão 8.0, (San Diego, CA, EUA). A análise comparativa entre dois grupos independentes foi realizada pelo teste t de Student para dados paramétricos e pelo teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos. Para comparações múltiplas entre subgrupos, todos os dados que seguiram distribuição paramétrica foram analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste post-hoc de Tukey. Para os dados não paramétricos, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn entre subgrupos. O perfil de mediadores imunológicos solúveis séricos e TA ao longo da linha do tempo cinética foi realizado por uma análise transversal juntamente com cinco pontos de tempo programados consecutivos (Dias = D), incluindo D0-1, D2-6, D7, D8-13, D >14 após admissão na UTI pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn para comparações pareadas com o ponto de tempo imediatamente anterior. Além disso, o teste de Mann-Whitney foi empregado para comparações entre subgrupos em pontos de tempo correspondentes. Em todos os casos, um limiar de  $p < 0,05$  foi considerado para significância estatística.

Para análise de correlação dos dados com distribuição paramétrica foi empregado o teste de correlação de Pearson, enquanto o teste de correlação de Spearman foi empregado para dados com distribuição não paramétrica. Os escores “r” significativos foram empregados para montar matrizes de rede abrangentes.

As redes foram construídas usando um layout baseado em excentricidade empregando a plataforma de software de código aberto Cytoscape para visualização de redes complexas (disponível em <https://cytoscape.org>). Os nós da rede representam os mediadores imunes solúveis no soro e TA, incluindo quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento. As arestas de conexão ilustram correlações fracas/moderadas (“r” entre  $|0,1$  a  $0,67|$ ) e fortes correlações (“r” pontuações  $\geq |0,67|$ ) entre pares de atributos. Atributos sem correlações fortes são distribuídos na periferia da rede. Mediadores solúveis séricos apresentando pelo menos 5 correlações fortes são montados no centro com o número

de mediadores solúveis séricos e conexões entre eles usados para definir a conectividade central.

A análise da magnitude das alterações nos mediadores imunológicos solúveis séricos e TA em pacientes com COVID-19 foi realizada calculando a razão de proporção entre os valores individuais de cada mediador imunológico solúvel sobre o valor mediano observado no respectivo soro (HC) e TA (NI) grupos de controle.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Visão panorâmica de mediadores imunológicos solúveis séricos em pacientes com COVID-19 grave

De modo a caracterizar o perfil imunológico sistêmico de COVID-19 grave, a concentração sérica de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias/reguladoras e fatores de crescimento foram quantificados em amostras de soro de pacientes com covid-19 grave em comparação com controles saudáveis pré-pandemia (HC) (Figura 9). O grupo COVID-19 apresentou maiores níveis de mediadores imunológicos solúveis séricos, caracterizados pelos níveis aumentados de CXCL8, CCL3, CCL4, CCL2, CXCL10, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, IL-12, IFN- $\gamma$ , IL -1Ra, IL-9, G-CSF e IL-2 juntamente com níveis diminuídos de CCL11, CCL5, IL-15, IL-17, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, FGF- básico, PDGF, VEGF, GM-CSF e IL-7 (Figura 9).

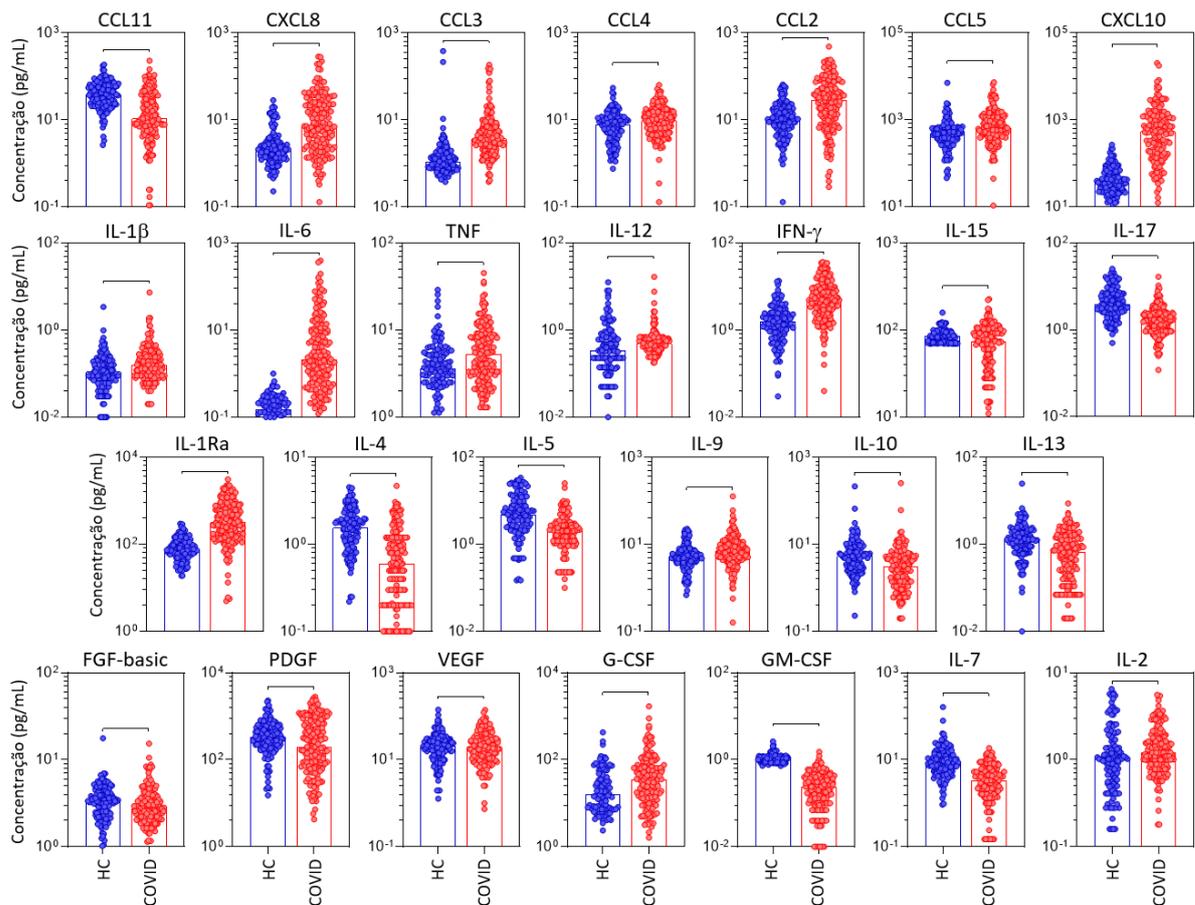


Figura 9- Avaliação de mediadores imunológicos solúveis séricos em pacientes com COVID-19 grave em admissão na UTI. A concentração de quimiocinas (CXCL8,CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10), citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-15, IL-17), citocinas reguladoras (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9,IL-10, IL-13) e fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-7 e IL-2) foram quantificados em amostras de soro de pacientes com COVID-19 grave -“COVID” (●, n = 183), em comparação com controles saudáveis pré-pandemia – “HC” (●, n = 135) em admissão na UTI (D0 = linha de base). As medições foram realizadas por matriz de microesferas de alto rendimento, conforme descrito na seção Material e Métodos. Os resultados são expressos em pg/mL e apresentados como distribuição de dispersão de valores sobre gráficos de barras sublinhando o valor mediano em cada barra. Diferenças significativas em  $p < 0,05$  são indicadas por linhas de conexão.

A magnitude das alterações nos mediadores imunológicos solúveis demonstrou que CXCL10(15x), IL-6(14x), IL-1Ra; CXCL8(4x) e CCL3; IFN- $\gamma$ ; CCL2 (3x) apresentaram os maiores incrementos (aumento/valores) de acordo com os valores medianos observados nos controles saudáveis pré-pandemia. Por outro lado, IL-17; IL-5; IL-4; IL-7 (-0,4x), CCL11(-0,3x) e GM-CSF (-0,2x) apresentaram os menores valores de acordo com os valores medianos observados para o grupo de controles saudáveis (Figura 10).

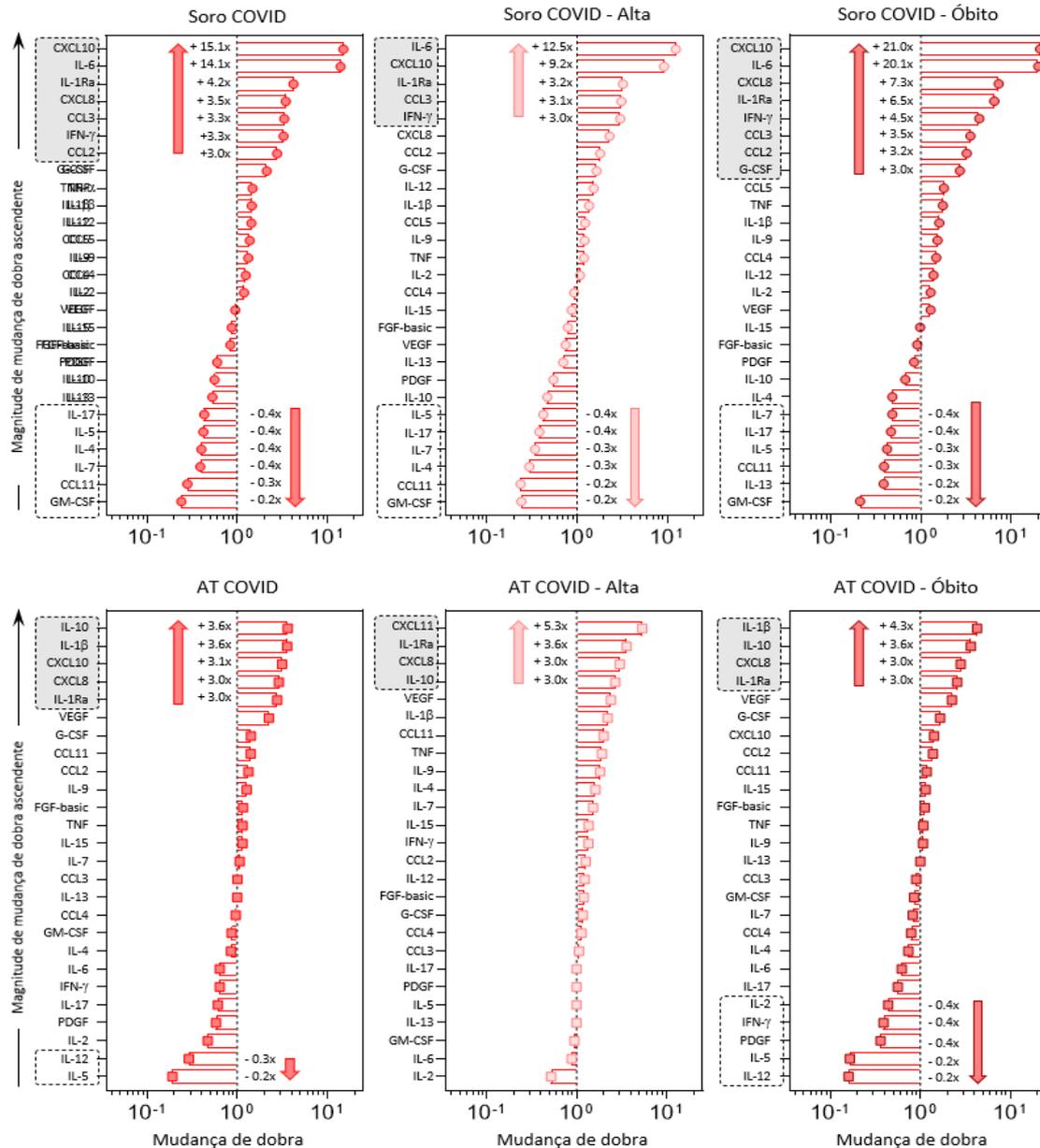


Figura 10 - Magnitude das alterações no soro e no sistema de mediadores imunológicos solúveis presentes nas vias aéreas de pacientes com COVID-19 grave. A magnitude das mudanças nos níveis de quimiocinas (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CXCL10), citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, IL-6, TNF, IL-12, IFN-γ, IL-15, IL-17), citocinas reguladoras (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) e fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-7 e IL-2) foram calculados para amostras individuais de pacientes com COVID-19 – “COVID” (soro = , n=183; TA = , n=103), ainda classificado de acordo com a doença resultado: referido como “Alta” (soro = , n=97; AT = ; n=37) ou “óbito” (soro = , n=86; TA = , n=66). As medições de mediadores solúveis foram realizadas na Plataforma Luminex Bio-plex conforme descrito na seção de materiais e métodos. A magnitude de alterações nos mediadores séricos solúveis e imunes TA foi calculado como proporção da razão de valores individuais de acordo com os valores medianos observados em amostras de soro de controles

saudáveis pré-pandêmicos (HC) e aspirados traqueais de pacientes não infectados (NI). Os resultados são expressos como valores medianos e apresentados em formato de gráfico de barras como magnitude de mudança de dobra ascendente. Os mediadores solúveis com níveis diminuídos ( $<-0,4$ ) e níveis aumentados ( $>+3$ ) foram destacados por setas para cima ou para baixo, respectivamente.

## 5.2 Visão panorâmica dos mediadores imunológicos solúveis séricos em pacientes críticos com COVID-19 de acordo com o resultado da doença

O perfil dos mediadores solúveis séricos em pacientes críticos com COVID-19 foi também avaliado de acordo com o desfecho da doença: alta ou óbito. Os resultados mostraram que níveis aumentados de quimiocinas (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10), citocinas pró-inflamatórias (TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17), citocinas regulatórias (IL-1Ra, IL-4, IL-9) e fatores de crescimento (FGF-básico, VEGF, G-CSF, IL-7 e IL-2) foram observados em pacientes com COVID-19 que evoluíram para óbito em comparação ao subgrupo alta. Por outro lado, os níveis de GM-CSF foram reduzidos em pacientes com COVID-19 que evoluíram para óbito em comparação com o subgrupo alta (Figura 11).

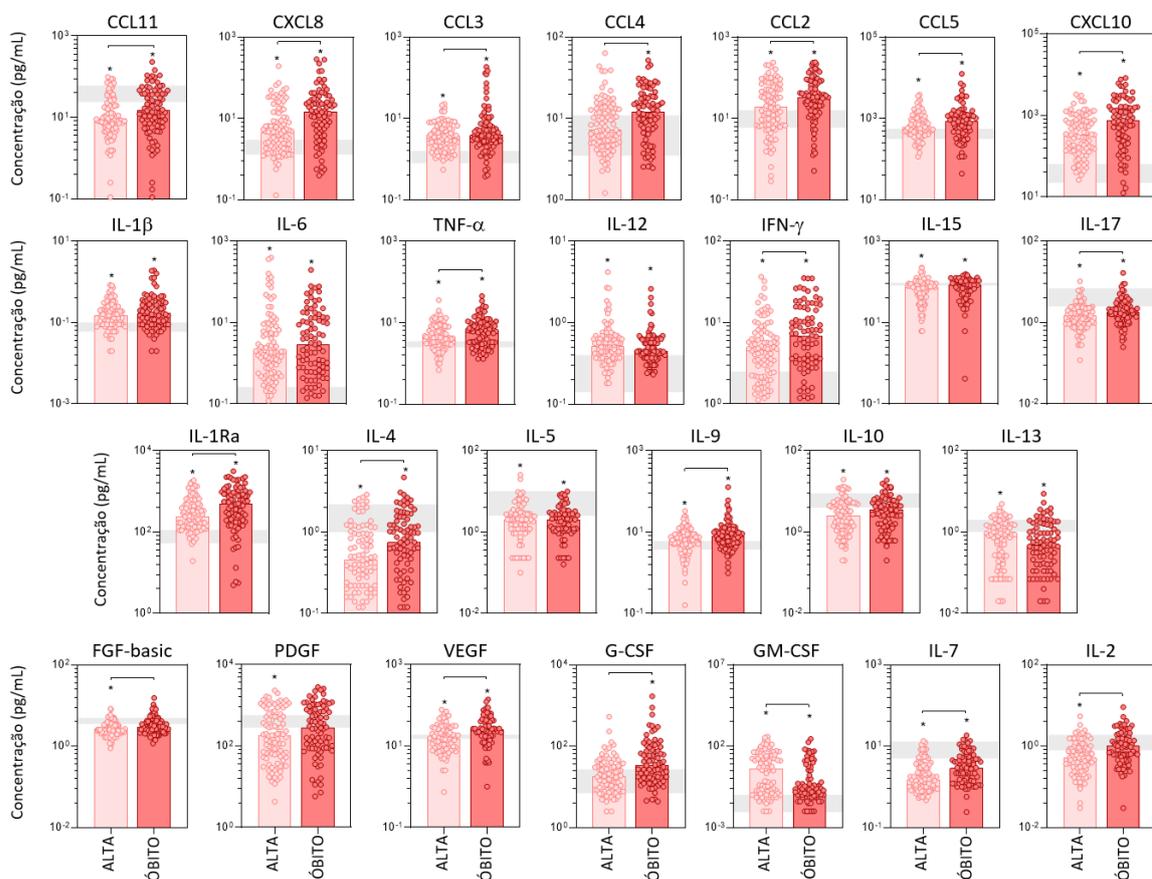


Figura 11 - Análise dos mediadores imunológicos solúveis séricos em pacientes com COVID-19 grave em admissão na UTI, de acordo com o desfecho da doença (alta vs óbito). O concentração de quimiocinas (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10), citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-15, IL-17), citocinas regulatórias (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) e fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-7 e IL-2) foram quantificados no soro amostras de pacientes com COVID-19 grave (n = 183) em admissão na UTI (D0 = linha de base), categorizados ainda de acordo com o resultado da doença, referido como “Alta” (●, n = 97) ou “Óbito” (●, n = 86). A zona cinza representa o intervalo interquartil de referência (25<sup>o</sup>-75<sup>o</sup>) observado para controles saudáveis pré-pandemia “HC” (n = 135). As medições foram realizadas por matriz de microesferas de alto rendimento, conforme descrito na seção Material e Métodos. Os resultados são expressos em pg/mL e apresentados como distribuição de dispersão de valores individuais sobre gráficos de barras, ressaltando o valor mediano em cada barra. Diferenças significativas em  $p < 0,05$  são indicados por asterisco (\*) em relação ao HC e por linhas de conexão para comparações entre Alta versus Óbito.

Dentro deste contexto das diferenças de desfechos clínicos, análises prévias da magnitude das alterações nos mediadores imunológicos solúveis no soro demonstram que CXCL10 (21x), IL-6(20x), CXCL8; IL-1Ra (7x), IFN- $\gamma$ (5x), CCL3(4x) e CCL2 (3x) alcançou a maior regulação positiva em pacientes com COVID-19 que evoluíram para óbito, enquanto IL-6 (13x), CXCL10 (9x) e IL-1Ra; CCL3; IFN- $\gamma$  (3x) aumentaram em menor magnitude em pacientes que evoluíram para alta (figura 10). Uma diminuição geral (<-0,4) de CCL11, IL-17, IL-5, GM-CSF e IL-7 foi observada em pacientes com COVID-19, independentemente do resultado da doença, com IL-4 (-0,3x) e IL-13 (-0,2x) observados em pacientes que evoluíram para alta ou óbito, respectivamente, como observado na figura 10.

### **5.3 Análise de correlação integrativa e redes de mediadores imunológicos solúveis em amostras de soro de pacientes com COVID-19 grave**

A interação entre mediadores solúveis séricos em pacientes com COVID-19 grave foi avaliada por abordagens de biologia de sistemas com base em matrizes e redes de correlação abrangentes e os dados apresentados na Figura 12. Os resultados mostraram que os pacientes com COVID-19 exibiram uma rede com maior grau entrópico com maior número de conectividade central (n=46), caracterizado por um forte centro de 8 mediadores imunes solúveis (CXCL8, CCL3, CCL4, CCL2, IL-1Ra, IL-4, VEGF e G-CSF). Por outro lado, o HC apresentou uma rede com um pequeno

aglomerado central formado por apenas 4 moléculas (CXCL8, IL-15, IL-17 e IL-4) (Figura 12).

O perfil de rede de pacientes com COVID-19 que evoluíram para óbito revelou um padrão entrópico mais alto e com o centro de correlação forte (CXCL8, CCL3, CCL2, CXCL10, IL-1Ra, IL-4, VEGF e G-CSF), em contrapartida, foi observado em pacientes com COVID-19 uma evolução para alta com aumento de: CXCL8 e IL-1Ra) (Figura 12).

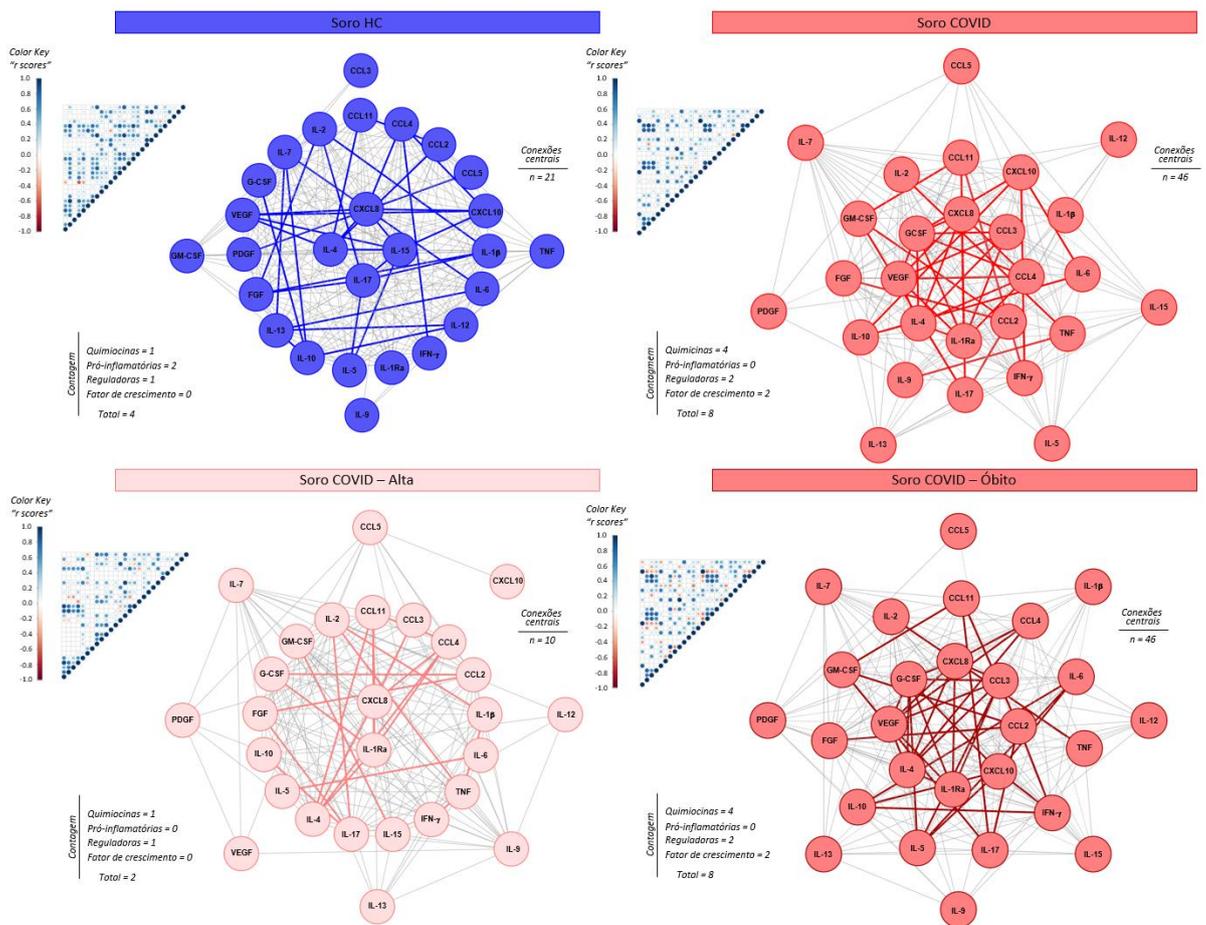


Figura 12- Matrizes de correlação integrativa e análise de redes de mediadores imunológicos solúveis séricos em pacientes com COVID-19 grave em admissão na UTI. Matrizes de correlação abrangentes foram montadas com base nos escores "r" de Pearson e Spearman entre quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas e fatores de crescimento medidos em amostras de soro de pacientes com COVID-19 criticamente doentes - "COVID" (●, n = 183) em admissão na UTI (D0 = linha de base), adicionalmente classificados de acordo com o desfecho da doença: referidos como "Alta" (●, n = 97) ou "Óbito" (●, n = 86) e controles saudáveis pré-pandemia – "HC" (●, n = 135). Os mediadores solúveis foram medidos por matriz de microesferas de alto rendimento, conforme descrito na seção Material e Métodos. As matrizes de correlação panorâmica são mostradas como modelos de triângulo com cada interseção quadrada representando a pontuação de correlação "r" entre pares de atributos. Os escores "r" de correlações significativas ( $p < 0,05$ ) são representados por círculos de tamanhos proporcionais,

escalados de -1 a +1 com gradiente para negativo (pontos vermelhos) e positivo (pontos azuis) de acordo com a chave de cor fornecido na figura. Os quadrados brancos representam correlações não significativas. As redes foram construídas usando um layout baseado em excentricidade, considerando todos as correlações. Os nós representam as quimiocinas (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CXCL10), citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-15, IL-17), citocinas reguladoras (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) e fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-7 e IL-2). Bordas de conexão ilustram pontuações fracas/moderadas (“r” entre |0,1 a 0,67|, linhas finas cinza) e forte correlação (“r” pontuações  $\geq$  |0,67|, linhas grossas coloridas) entre pares de atributos. As correlações negativas são sublinhadas por linhas tracejadas. Atributos sem correlações fortes são distribuídos na periferia da rede. Mediadores solúveis séricos apresentados em pelo menos 5 correlações fortes são montadas no centro com o número de cada categoria e as conexões entre elas (conectividade central).

#### **5.4 Linha do tempo cinética de mediadores imunológicos solúveis séricos em pacientes com COVID-19 grave**

Com o objetivo de investigar ainda mais o perfil temporal de mediadores solúveis séricos de pacientes com COVID-19 grave, uma análise transversal da linha do tempo cinética foi realizada em quatro pontos de tempo consecutivos (Dias = D), incluindo: D0 (n = 183), D2-6 (n=99), D7 (n=80), D8-13 (n=50) e D>14 (n=65) após admissão na UTI (Figura 13). A análise dos dados demonstrou uma tendência clara para uma onda cinética bimodal de mediadores imunológicos solúveis séricos em pacientes com COVID, exceto para IL-1 $\beta$ , TNF e IL-5. Picos em D2-6 e D8-13 foram observados para quimiocinas (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10), citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IL-17), citocinas reguladoras (IL-1Ra, IL-4, IL-9, IL-10) e fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, G-CSF, IL-7 e IL-2). Por outro lado, o perfil bimodal invertido foi observado para IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-15, IL-13 e GM-CSF com vales observados na linha do tempo cinética em D2-6 e D8-13 (Figura 13).

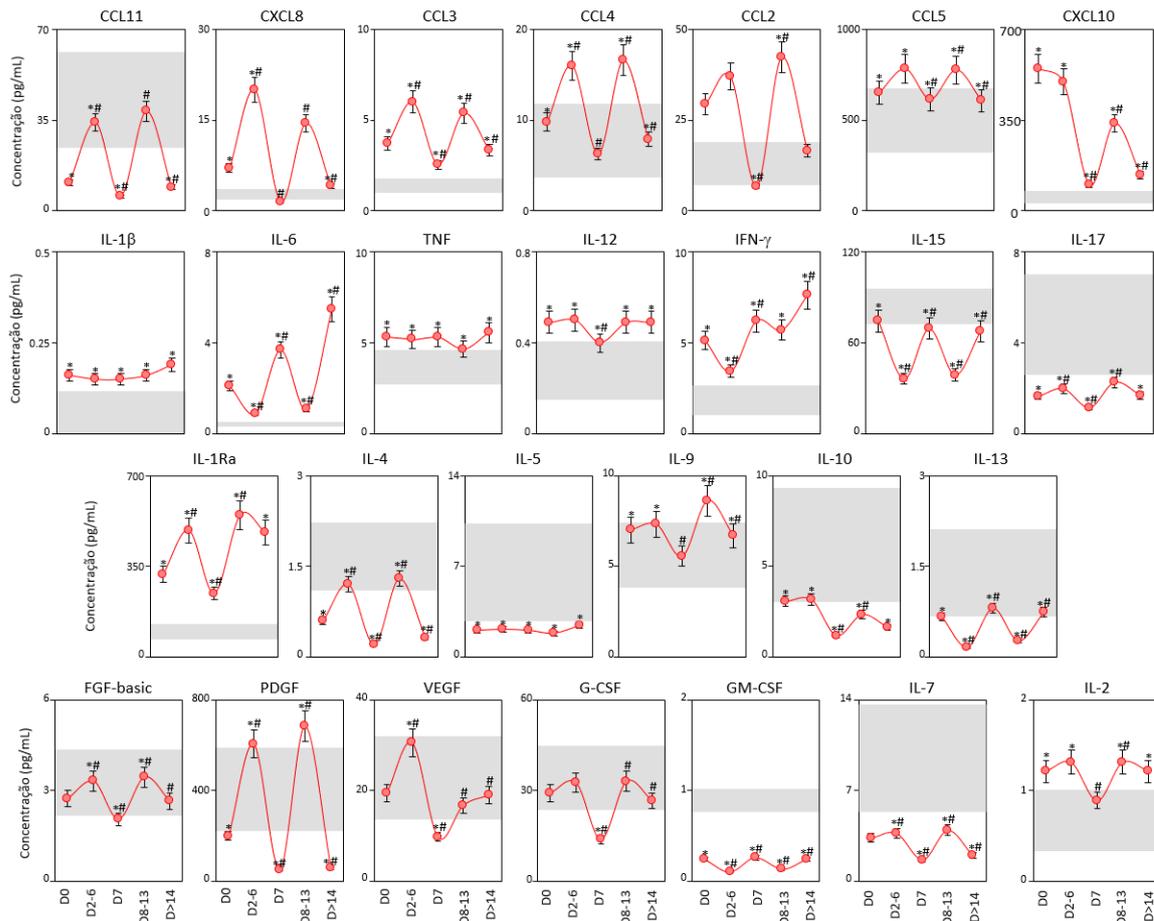


Figura 13 - Linha do tempo cinética de mediadores imunológicos solúveis em amostras de soro de pacientes com COVID-19 grave. O perfil cinético de quimiocinas (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10), citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-15, IL-17), citocinas reguladoras (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL 13) e fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-7 e IL-2) foram avaliados em amostras de soro de pacientes com COVID-19 grave ( $\bullet$ ,  $n = 183$ ) por análise transversal em quatro pontos de tempo consecutivos (Dias = D), incluindo: D0 ( $n = 183$ ), D2-6 ( $n = 99$ ), D7 ( $n = 80$ ), D8-13 ( $n = 50$ ) e D>14-36 ( $n = 65$ ) após admissão na UTI. As medições foram realizadas por matriz de microesferas de alto rendimento, conforme descrito na seção Material e Métodos. Os resultados são apresentados como gráfico de linhas de valores medianos ( $\pm 10\%$  da mediana) em cada ponto de tempo ao longo da linha do tempo cinética. A zona cinza representa o intervalo interquartil de referência (25<sup>o</sup>-75<sup>o</sup>) observado para controles saudáveis pré-pandemia “HC” ( $n = 135$ ). Diferenças significativas em  $p < 0,05$  são identificadas por asteriscos (\*) em comparação com “HC” e por hashtag (#) para o ponto de tempo imediatamente anterior.

O perfil cinético de pacientes com COVID-19 grave foi classificado e avaliado de acordo com o desfecho da doença, sendo alta ou óbito. Os resultados demonstraram que os pacientes que evoluíram para óbito apresentaram um aumento de acordo com o tempo em quase todos os mediadores imunes solúveis em comparação aos

pacientes que evoluíram para alta, exceto para IL-12, IL-5 e IL-13. É importante resaltar que os níveis de PDGF foram significativamente menores em D2-6 em pacientes que evoluíram para óbito em comparação com pacientes que evoluíram para alta. No entanto, CCL3, IL-15, IL-17, PDGF, VEGF e GM-CSF só apresentaram diferenças em pontos de tempo anteriores até D7 (Figura 14).

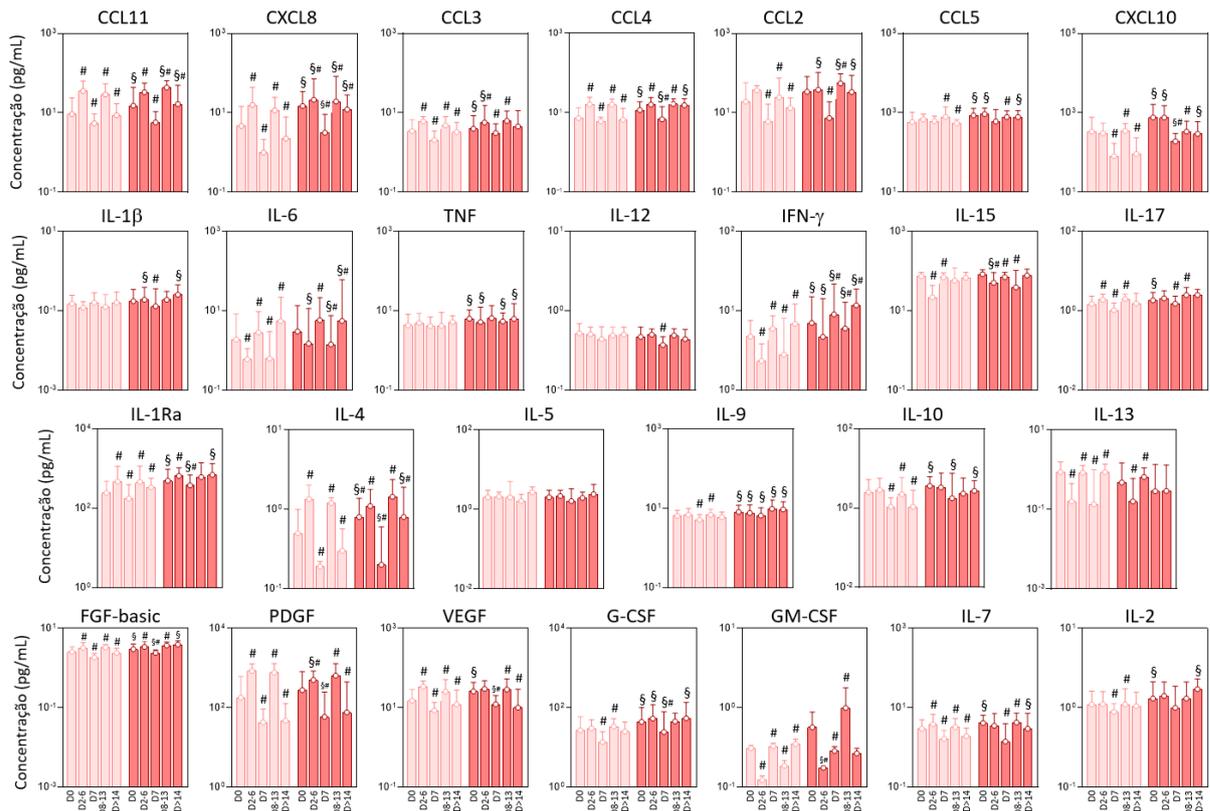


Figura 14 - Linha do tempo cinética de mediadores imunológicos solúveis séricos em pacientes criticamente doentes com COVID-19, de acordo com o resultado da doença. O perfil cinético de quimiocinas (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10), pró-inflamatórias citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-15, IL-17), citocinas reguladoras (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) e fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-7 e IL-2) foi avaliado em amostras de soro de pacientes com COVID-19 grave (n=183), ainda categorizados de acordo com o desfecho da doença, referidos como “Alta” ( , n=97) ou “Óbito” ( , n=86). A linha do tempo cinética foi avaliada por análise transversal em quatro pontos de tempo consecutivos (Dias = D), incluindo: D0 (n=97;86), D2-6 (n=36;63), D7 (n=54;26), D8-13 (n=20;30), e D>14-36 (n=43; 22) após a admissão na UTI. As medições foram realizadas por microesferas de alto rendimento conforme descrito na seção Material e Métodos. Os resultados são apresentados como gráfico de barras de valores medianos e intervalo interquartil em cada ponto a ao longo da cinética de tempo de cada barra. Diferenças significativas em  $p < 0,05$  são identificadas pela hashtag (#) para comparações com o ponto imediatamente anterior e por “§” para comparações entre os subgrupos “Alta” vs “Óbito” em pontos de tempo correspondentes.

### **5.5 Panorama de mediadores imunológicos solúveis em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 grave**

A concentração de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento foram quantificados em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 grave – “COVID”, em comparação com pacientes não infectados – “NI” sob ventilação mecânica na UTI (Figura 15). Os resultados mostraram um aumento mais restrito e seletivo de CXCL8, CCL2, IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-9, IL-10 e VEGF, bem como níveis diminuídos de IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-5, e IL-2 em comparação com NI (Figura 15). A magnitude das alterações nos mediadores imunológicos solúveis do aspirado traqueal é mostrada na Figura 10, apresentada anteriormente. Os resultados demonstraram que IL-10; IL-1 $\beta$ (4x) e CXCL10; CXCL8; IL-1Ra(3x) exibiram os maiores incrementos de acordo com os valores medianos observados no grupo controle NI. Por outro lado, IL-12(-0,3x) e IL-5(-0,2x) apresentaram os menores valores de acordo com os valores medianos observados para o grupo N, conforme foi observado na figura 10.

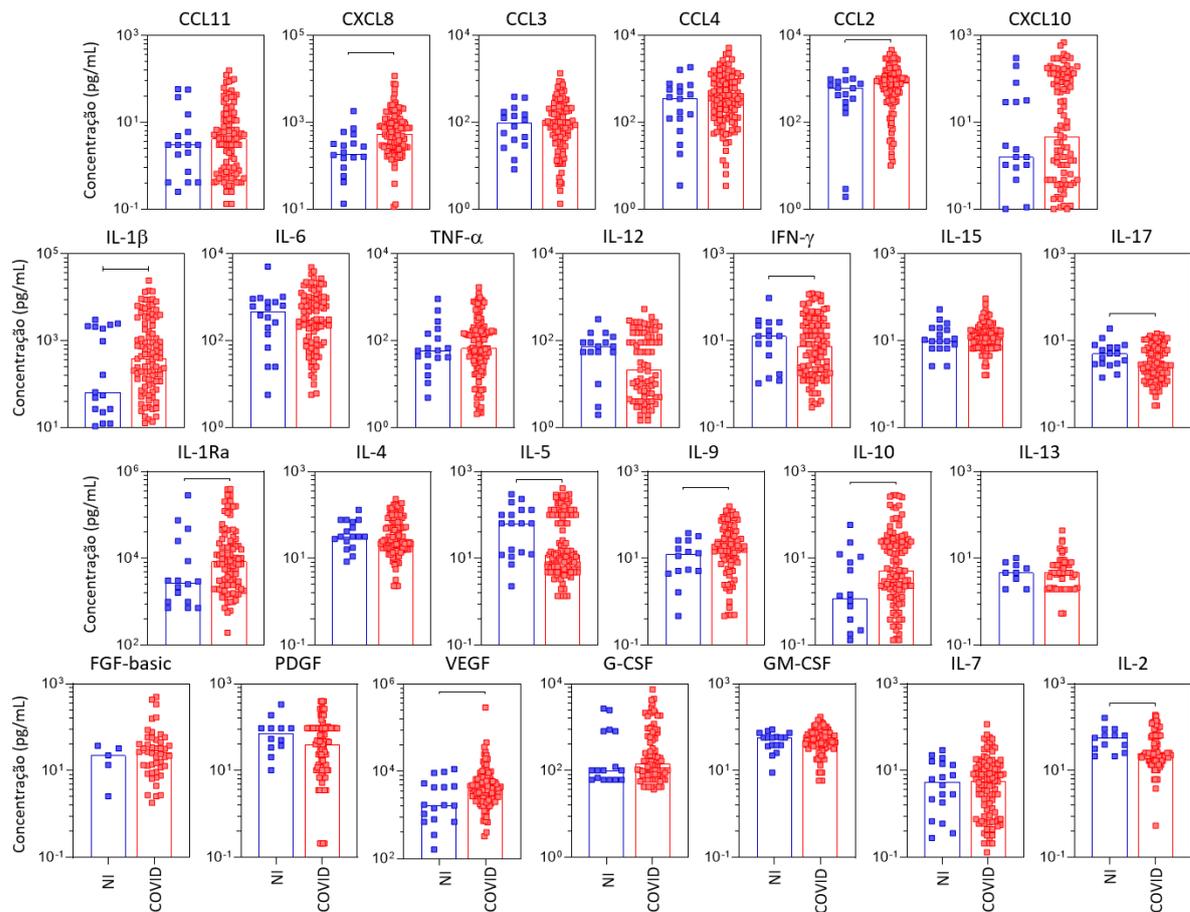


Figura 15 - Panorama de mediadores imunológicos solúveis nas vias aéreas em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 grave em admissão na UTI. A concentração de quimiocinas (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CXCL10), citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-15, IL-17), citocinas regulatórias (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) e fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-7 e IL-2) foram quantificados em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 grave – “COVID” (■, n = 103 em admissão na UTI (D0 = linha de base), em comparação com pacientes não infectados – “NI” (■, n = 18). As medições foram realizadas por matriz de microesferas de alto rendimento, conforme descrito na seção Material e Métodos. Os resultados são expressos em pg/mL e apresentados como distribuição de dispersão de valores individuais sobre gráficos de barras, ressaltando o valor mediano em cada barra. Diferenças significativas em  $p < 0,05$  são indicadas por linhas de conexão.

## 5.6 Perfil de mediadores imunes solúveis em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 grave de acordo com o desfecho da doença

O perfil de mediadores solúveis séricos em AT de pacientes em estado grave com COVID-19 foi ainda caracterizado com base no desfecho da doença: alta ou óbito. A análise dos dados demonstrou que os pacientes com COVID-19 que evoluíram para

óbito apresentaram níveis significativamente mais baixos de citocinas pró-inflamatórias IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-17, citocinas reguladoras IL-4, IL-5 e fatores de crescimento PDGF, IL-7 e IL-2 em comparação com o subgrupo de alta. Por outro lado, a citocina reguladora IL-10 foi a única molécula elevada em pacientes com COVID-19 que evoluíram para óbito em comparação com o desfecho de alta (Figura 16). Análises adicionais da magnitude das alterações nos mediadores imunológicos solúveis séricos demonstram que IL-10; IL1 $\beta$ (4x) e CXCL8; IL-1Ra(3x) alcançaram a maior regulação positiva em pacientes com COVID-19 evoluindo para morte enquanto CXCL10(5x), IL-1Ra (4x) e CXCL8; IL-10(3x) estavam aumentados em pacientes que evoluíram para alta. Enquanto uma diminuição (<0,4) de IL-2, IFN- $\gamma$ , PDGF, IL-5 e IL-12 foi observada em pacientes com COVID-19 que evoluíram para óbito, nenhuma diminuição significativa foi observada em pacientes com COVID-19 que evoluíram para alta, conforme foi observado na figura 10.

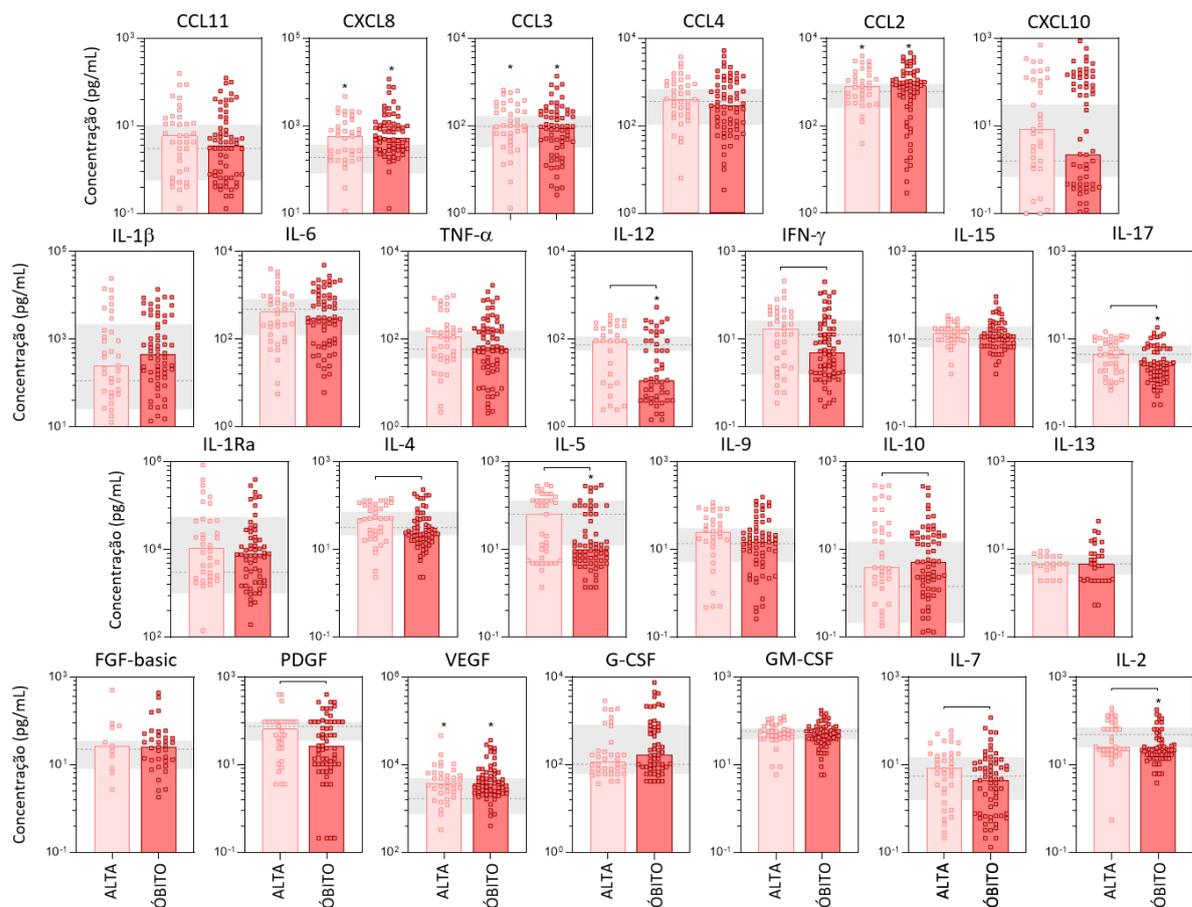


Figura 16 - Perfil de mediadores imunológicos solúveis nas vias aéreas em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 grave em admissão na UTI, de acordo com o desfecho da doença. A concentração de quimiocinas (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CXCL10), citocinas pró-

inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-15, IL-17), citocinas regulatórias (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) e fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-7 e IL-2) foram quantificados no aspirado traqueal em amostras de pacientes com COVID-19 grave - "COVID" (n = 103) em admissão na UTI (D0 = linha de base), ainda categorizados de acordo com o resultado da doença, encaminhados como "Alta" (■, n = 37) ou "Óbito" (■, n = 66). A zona cinza representa o intervalo interquartil de referência (25<sup>o</sup>-75<sup>o</sup>) e foi observado em pacientes não infectados "NI" (n=18). As medições foram realizadas por matriz de microesferas de alto rendimento, conforme descrito na seção Material e Métodos. Os resultados são expressos em pg/mL e apresentado como distribuição de dispersão de valores individuais sobre gráficos de barras, ressaltando o valor mediano em cada barra. Diferenças significativas em  $p < 0,05$  são indicadas por asterisco (\*) em relação ao NI e ligando as linhas para comparações entre Alta versus Óbito.

### **5.7 Matrizes de correlação integrativa e análise de redes de mediadores imunológicos solúveis em aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 grave**

As abordagens da biologia do sistema foram empregadas para construir matrizes de correlação abrangentes ao lado de redes excêntricas para entender a conectividade integrativa entre mediadores imunológicos solúveis em aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 grave. Os resultados demonstraram que os pacientes com COVID-19 apresentaram uma perda de conectividade central em comparação como grupo NI. Além disso, pacientes com COVID-19 que evoluíram para óbito apresentaram maior número de conectividade entre quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento em comparação com pacientes com COVID-19 que evoluíram para alta, que apresentaram número consideravelmente menor de conexões sem participação de fatores de crescimento (Figura 17).

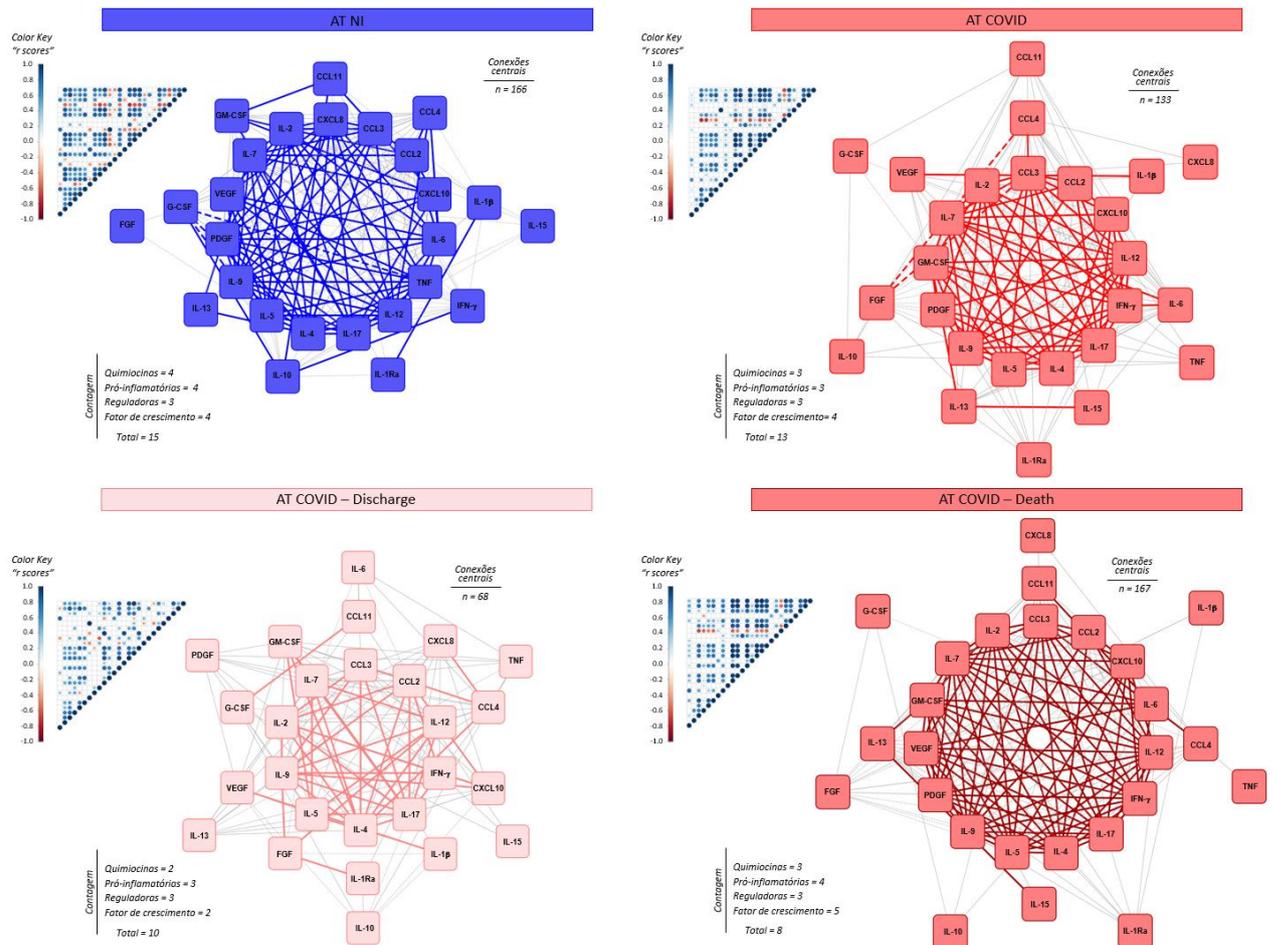


Figura17-Matrizes de correlação de redes integrativas e análise de redes de mediadores imunológicos solúveis nas vias aéreas em aspirados traqueais de pacientes com COVID-19 grave em admissão na UTI. Matrizes de correlação abrangentes foram montadas com base nos escores "r" de Pearson e Spearman entre quimiocinas, pró-inflamatórios citocinas, citocinas regulatórias e fatores de crescimento medidos em aspirados traqueais de pacientes com COVID-19 grave (■, n = 103) em admissão na UTI (D0 = linha de base), ainda classificados de acordo com o desfecho da doença: referidos como "Alta" (■, n = 37) ou "Óbito" (■, n = 66) e pacientes não infectados – "NI" (■, n = 18). Os mediadores solúveis foram medidos por matriz de microesferas de alto rendimento, conforme descrito na seção Material e Métodos. Matrizes de correlação panorâmica são mostradas como triângulo em modelos com cada interseção quadrada, representando a pontuação de correlação "r" entre pares de atributos. Os escores "r" de correlações significativas ( $p < 0,05$ ) são representados por círculos de tamanhos proporcionais, escalados de -1 a +1 com gradiente para negativo (pontos vermelhos) e positivo (pontos azuis) de acordo com a chave de cores fornecida na figura. Os quadrados brancos representam correlações não significativas. As redes foram construídas usando um layout baseado em excentricidade, considerando todas as correlações significativas. Os nós representam o quimiocinas (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CXCL10), citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-15, IL-17), citocinas reguladoras (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) e fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-7 e IL-2). As arestas de conexão ilustram pontuações

“r” fracas/moderadas entre  $|0,1$  a  $0,67|$ , linhas finas cinzas) e fortes correlações (“r” pontuações  $\geq |0,67|$ , linhas grossas coloridas) entre pares de atributos. As correlações negativas são sublinhadas por linhas tracejadas. Atributos sem correlações fortes são distribuídos na periferia da rede. Mediadores solúveis séricos apresentando pelo menos 5 correlações fortes são montados no centro com o número de cada categoria e as conexões entre elas (conectividade central).

### **5.8 Cinética de mediadores imunológicos solúveis em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 grave**

A linha do tempo cinética de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas regulatórias e fatores de crescimento foi caracterizada em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 grave por análise transversal em quatro momentos consecutivos estudados após a admissão na UTI. A análise dos dados mostrou que a maioria dos mediadores solúveis apresentou distribuição bimodal invertida, com vales em D2-6 e D8-13 e pico em torno de D7(figura18).

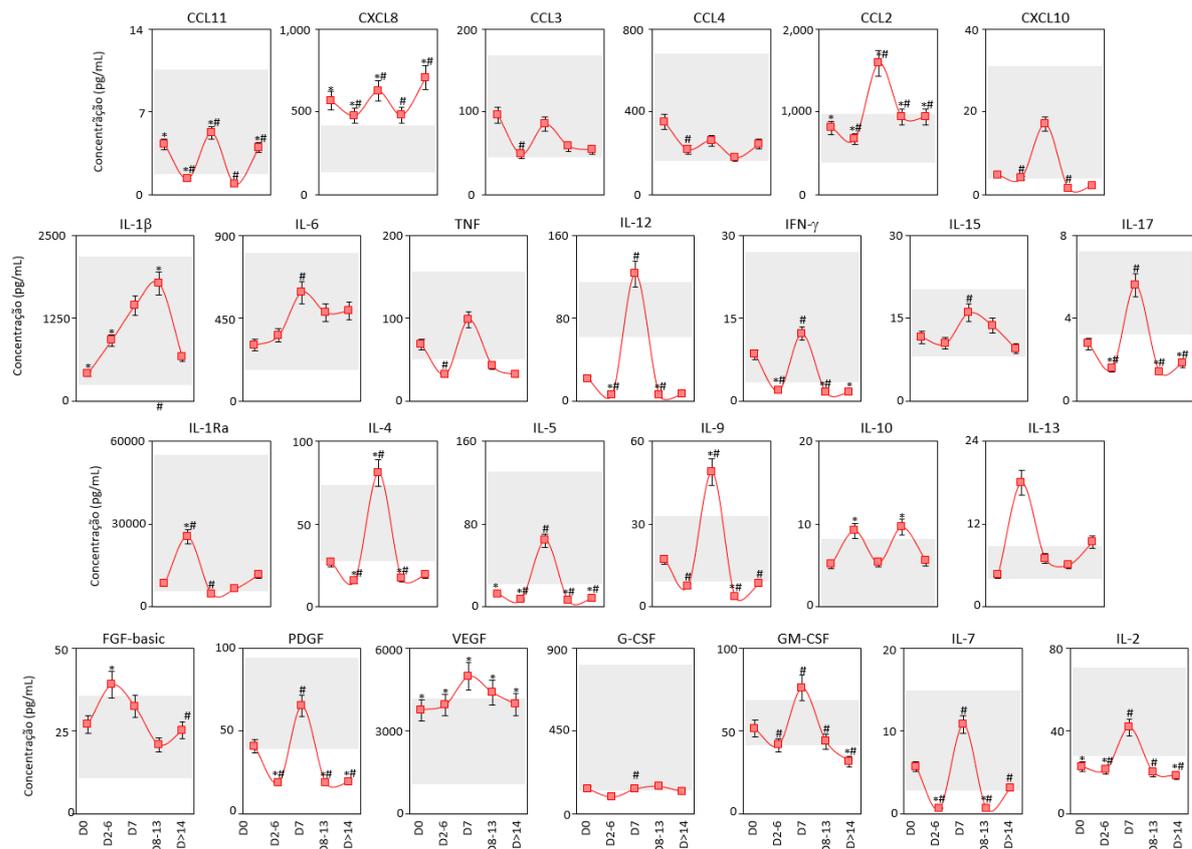


Figura 18-Cinética de mediadores imunológicos solúveis nas vias aéreas em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 grave. A linha do tempo cinética das quimiocinas (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CXCL10), citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-15, IL-17), citocinas reguladoras (IL -1Ra, IL-4, IL-5, IL 9, IL-10, IL-13) e fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-7 e IL-2 ) foi avaliado em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 grave (■, n = 103) por análise transversal em cinco pontos de tempo consecutivos (Dias = D), incluindo: D0 (n=103), D2-6 (n=37), D7 (n=19), D8 -13 (n=20) e D > 14-36 (n=19) após admissão na UTI. Os resultados são apresentados como um gráfico de linhas de valores medianos e intervalo interquartil em cada ponto de tempo ao longo da linha de tempo cinética. A zona cinza representa o interquartil de referência intervalo (25<sup>o</sup>-75<sup>o</sup>) observado para pacientes não infectados “NI” (n=18). Diferenças significativas em p < 0,05 são identificadas por asteriscos (\*) em comparação com “NI” e por hashtag (#) para o ponto de tempo imediatamente anterior.

Curiosamente, IL-10 apresentou uma distribuição bimodal oposta com picos em D2-6 e D8-13. A análise dos mediadores imunes solúveis do TA também foi realizada à luz do desfecho da doença para alta ou óbito. A análise de dados demonstrou que os pacientes com COVID-19 que progrediram para óbito apresentaram níveis mais baixos de CXCL10, IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-4, IL-5, IL-10, PDGF, G-CSF, GM-CSF, IL-7 e IL-2 em comparação com pacientes com COVID-19 que evoluem para alta (Figura 19).

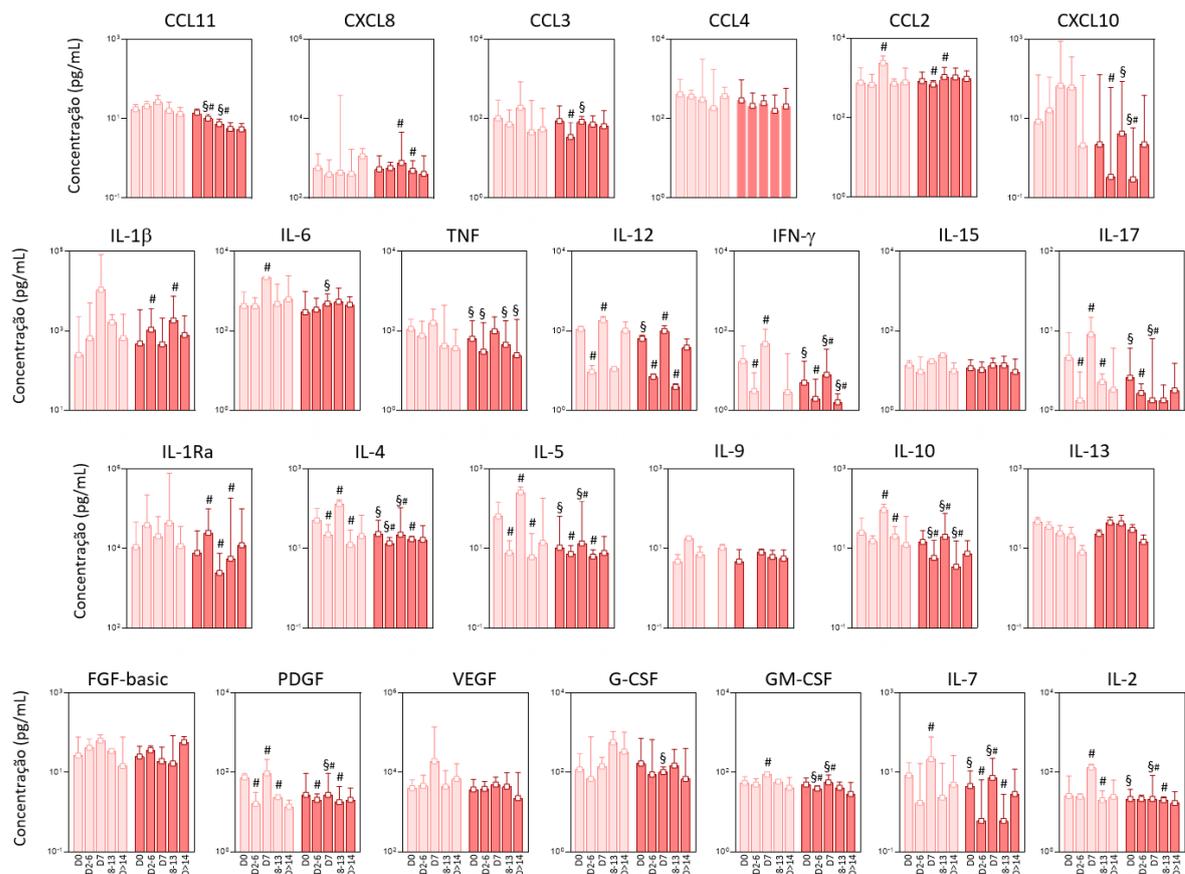


Figura 19-Linha do tempo cinética de mediadores imunológicos solúveis nas vias aéreas em aspirados traqueais em pacientes com COVID-19 grave, de acordo com o resultado da doença. O perfil cinético de quimiocinas (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CXCL10), citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-15, IL-17), citocinas reguladoras (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) e fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-7 e IL-2) foi avaliado em aspirados traqueais de pacientes com COVID-19 grave (n = 103), categorizados ainda de acordo com o desfecho doença, referido como “Alta” (■, n=37) ou “Óbito” (■, n=66). A linha do tempo cinética foi caracterizada por análise transversal em quatro momentos consecutivos (Dias = D), incluindo: D0 (n=37;66), D2-6 (n=10;30), D7 (n=06;13), D8-13 (n=03;18) e D>14-36 (n=07;12) após admissão na UTI. As medições foram realizadas por matriz de alto rendimento conforme descrito na seção Material e Métodos. Os

resultados são apresentados como gráfico de barras de valores medianos e intervalo interquartil em cada ponto ao longo da cinética de tempo. Diferenças significativas em  $p < 0,05$  são identificadas pela hashtag (#) para comparações com ponto de tempo imediatamente anterior e por “§” para comparações entre os subgrupos “Alta” vs “Óbito” em pontos de tempo correspondentes.

## 6 DISCUSSÃO

A pandemia desencadeada pelo SARS-CoV-2 e o aumento dos casos de COVID-19 com risco de vida destacaram um papel crucial de uma resposta imune eficaz/equilibrada do hospedeiro e o impacto destrutivo da desregulação imune, podendo evoluir para quadros graves da doença, sequelas e óbito (FAJGENBAUM e JUNE, 2020).

Houve um ávido debate sobre se o COVID-19 grave é de fato uma síndrome de tempestade de citocinas (MEHTA & FAJGENBAUM, 2021). É indiscutível, no entanto, que a hiperinflamação é um componente-chave da COVID-19 grave, geralmente associada a resultados ruins. Foi proposto que a “tempestade de citocinas” é um evento multifatorial envolvendo níveis elevados de mediadores imunológicos circulantes (MEHTA & FAJGENBAUM, 2021).

Não se sabe ou não há consenso de qual citocina está associada à resposta protetora versus patogênica. No entanto, os mecanismos detalhados associados a essa hiperativação não foram completamente caracterizados e as diferenças de tempo no microambiente sistêmico e das vias aéreas podem representar um evento chave para entender a fisiopatologia do COVID-19. Com o objetivo de melhor caracterizar esse fenômeno, o presente estudo foi desenhado para identificar possíveis biomarcadores com aplicação prognóstica e auxiliar nas intervenções terapêuticas para o manejo da COVID-19. A hipótese geral é que os perfis de mediadores solúveis e as mudanças nas amostras de soro e aspirado traqueal diferem em tempo e magnitude em pacientes com COVID-19 de acordo com o resultado da doença.

Para testar esta proposta, os níveis de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias/reguladoras e fatores de crescimento foram quantificados no soro e aspirados traqueais de pacientes com COVID-19 grave em momentos distintos (D0, D2-6, D7, D8-13 e D>14) na admissão à Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Nossos dados demonstraram que uma tempestade inflamatória maciça de mediadores solúveis foi observada em pacientes com COVID-19 em níveis aumentados em amostras de soro de pacientes com COVID-19. Além disso, observou-se um aumento mais acentuado nos pacientes que evoluíram para óbito em relação aos que evoluíram para alta. Por outro lado, uma regulação positiva mais restrita de mediadores solúveis foi observada em amostras de aspirado

traqueal, indicando que os compartimentos sistêmicos e locais divergem em seu meio inflamatório/regulatório.

Um perfil pró-inflamatório maciço mediado por IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF e IFN- $\gamma$ , juntamente com níveis mais baixos de IL-10, foi uma característica sistêmica de pacientes com COVID-19 grave. Por outro lado, um leve perfil pró-inflamatório mediado exclusivamente pelo aumento de IL-1 $\beta$ , com níveis inalterados de IL-6 e TNF e níveis mais baixos de IFN- $\gamma$  no microambiente regulado por IL-10, foi destacado no compartimento das vias aéreas. A análise dos mediadores solúveis de acordo com o desfecho da doença demonstrou uma regulação positiva adicional dos mediadores solúveis sistêmicos em pacientes que evoluíram para óbito. Por outro lado, no aspirado traqueal, níveis mais baixos de mediadores solúveis foram encontrados em pacientes que evoluíram para óbito. A análise da magnitude das alterações dos mediadores solúveis corrobora ainda mais as diferenças entre a resposta imune compartimentalizada sistêmica e das vias aéreas. Esse fenômeno foi consistentemente observado ao longo do seguimento do paciente.

Particularmente, os genes que codificam as citocinas CXCL8 (IL-8) IL-1 $\beta$  e IL-6 mostram uma expressão marcadamente alta em infecções por MERS-CoV (LAU *et al.*, 2013) e SARS-CoV-2 (SAMSAMI *et al.*, 2022). De acordo com nossos achados, estudos anteriores avaliando amostras de soro individuais de pacientes com COVID-19 revelaram uma inflamação aumentada e generalizada, caracterizada por um aumento significativo nos níveis circulantes de IL-6, IL1RA, CXCL8 (BLANCO-MELO *et al.*, 2020).

A elevação significativa de CXCL8, que é um mediador clássico de ativação de neutrófilos e quimioatrativo, indica a presença dessas células polimorfonucleares como impulsionador fundamental da imunopatogênese no COVID-19 (Cesta *et al.*, 2022). De acordo com essa hipótese, os neutrófilos foram encontrados como importantes causadores dos eventos trombóticos mórbidos e COVID-19 grave pela formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (ZUO *et al.*, 2020). De fato, o TNF na COVID-19 é mediado diretamente pelo SARS-CoV-2 (VERAS *et al.*, 2020). Embora todos esses estudos preliminares tenham sido realizados com um número limitado de amostras de pacientes, nossos achados concordam com esses relatos, demonstrando uma produção robusta da quimiocina de

neutrófilos CXCL8 como um mediador universal de COVID-19 nos compartimentos sistêmicos e das vias aéreas. Assim, os achados atuais e anteriores são indicativos de que o eixo CXCL8-neutrófilo seria um alvo putativo para intervenções terapêuticas (CESTA *et al.*, 2022).

Em relação à citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$ , conjunto de dados demonstraram resultados controversos com diferenças não significativas (BLANCO-MELO *et al.*, 2020) ou níveis aumentados em pacientes com COVID-19 (BERGANTINI *et al.*, 2022).

Nossos achados indicaram níveis elevados de IL-1 $\beta$  apenas sistemicamente em pacientes com COVID-19 e nenhuma significância foi encontrada nas vias aéreas ou quando grupos com resultados distintos foram comparados. As divergências observadas entre os estudos anteriores e os nossos podem ser decorrentes do menor tamanho amostral em estudos anteriores e dos vieses de idade e gênero. No entanto, o papel da IL-1 $\beta$  não pode ser descartado ou desconsiderado. Níveis significativamente elevados de modulador de IL-1 $\beta$ , IL-1RA, foram encontrados em pacientes com COVID-19 em amostras de soro e aspirado traqueal, o que poderia explicar parcialmente os níveis mais baixos de IL-1 $\beta$  no compartimento das vias aéreas. A IL-1RA foi surpreendentemente aumentada em estudos anteriores (BLANCO-MELO *et al.*, 2020), trazendo um potencial biomarcador universal para o acompanhamento do COVID-19. Além de participar da cascata do inflamassoma e dos mecanismos pró-inflamatórios, foi proposto que a IL-1 $\beta$  desencadeia a expressão aumentada do co-receptor SARS-CoV-2 TMPRSS2, facilitando a entrada nas células do vírus por meio de mecanismos envolvendo o p38 MAPK-GATA2 vias (CIOCARELLI *et al.*, 2021). Portanto, estudos adicionais em humanos e modelos de camundongos ainda são necessários para desvendar o papel da IL-1 $\beta$  durante COVID-19 grave.

Nossas descobertas fornecem evidências de que, embora uma tempestade maciça seja provocada sistemicamente, deficiências e lacunas na resposta imune local estão, de fato, associadas a um prognóstico ruim em pacientes com COVID-19 grave. O viés regulatório mediado por IL-10 no compartimento das vias aéreas, com ambiente pró-inflamatório restrito, pode orquestrar essas lacunas e deficiências, levando a um resultado fatal. Em contraste com nossos achados, para SARS-CoV-2, níveis aumentados de IL-10 no soro de pacientes com COVID-19

foram relatados e observados aqui, colocando essa citocina como possível biomarcador em relação à gravidade da doença (CHEN N, ZHOU M, DONG X, QU J, GONG F, HAN Y *et al.*, 2020). Os resultados opostos podem estar associados ao momento em que esta citocina foi medida. De fato, nossos achados mostram que a IL-10 apresentou cronogramas cinéticos únicos em amostras de soro e aspirado traqueal. Essa citocina regulatória apresentou distribuição bimodal com picos em D2-6 e D8-13 e queda em D7 tanto para aspirados traqueais quanto para amostras de soro.

Tendo em vista o papel da IL-6 no desencadeamento da patologia associada, várias propostas terapêuticas têm sido avaliadas para bloquear as vias de indução desta citocina. Estudos preliminares indicam que o Tocilizumab (anticorpo monoclonal humanizado recombinante) seria capaz de melhorar imediatamente a evolução clínica em pacientes críticos com COVID-19, devido ao bloqueio da resposta febril e inflamatória desencadeada pela IL-6, sendo um tratamento eficaz para reduzir a mortalidade (XU *et al.*, 2020), reduzindo a necessidade de ventilação mecânica e não invasiva (HERMINE *et al.*, 2020). O tocilizumab, um inibidor de IL-6, foi usado no estudo de Xu e colaboradores no tratamento de 21 pacientes com COVID-19 em estado crítico. Todos os pacientes apresentaram alta taxa de IL-6 antes da intervenção. A maioria apresentou melhora clínica de sintomas como hipóxia e alterações na opacidade da tomografia computadorizada (TC) imediatamente após o tratamento, sugerindo que esta poderia ser uma terapia eficiente para o tratamento da COVID-19.

Recentemente, uma investigação com uma grande coorte de pacientes propôs que os níveis séricos de IL-6 e TNF devem ser considerados no manejo e tratamento de pacientes com COVID-19 para estratificar ensaios clínicos prospectivos, orientar a alocação de recursos e informar oportunidades terapêuticas (DEL VALLE *et al.*, 2021). No presente estudo, os níveis de IL-6 e TNF foram significativamente elevados no soro, mas não nas vias aéreas, sugerindo que o microambiente das vias aéreas altamente regulado pode controlar esses dois mediadores inflamatórios. Portanto, embora promissores, esses dois mediadores devem ser considerados cuidadosamente como alvos para a terapia de COVID-19 com anticorpos monoclonais anti-IL-6 e anti-TNF.

Em relação à via do interferon, polimorfismos específicos em genes relacionados a citocinas estão fortemente associados ao desfecho da doença,

como os genes relacionados ao interferon (PAIRO-CASTINERA *et al.*, 2020). Investigações recentes mostraram que um pior prognóstico para COVID-19 está intimamente associado a polimorfismos em genes relacionados à produção de IFN- $\gamma$  e IL-12. De fato, nossos resultados mostram níveis mais baixos de IFN- $\gamma$  nas vias aéreas de pacientes críticos com COVID-19 e níveis mais baixos em pacientes que evoluem para o óbito, o que está de acordo com o papel protetor dos interferons em infecções virais (Blanco-Melo *et al.*, 2020). Além disso, a alta expressão da subunidade do receptor de interferon IFNAR2 esta associada a COVID-19 leve, indicando que o perfil pró-inflamatório das citocinas é importante para o desfecho da doença em COVID-19 (PAIRO-CASTINERA *et al.*, 2020; OLIVEIRA-PAIM *et al.*, 2021).

Embora o perfil imunológico grave da COVID-19 tenha sido inicialmente investigado, uma linha do tempo de eventos imunológicos não foi traçada especificamente, e ainda não se sabe o melhor momento para a ação de citocinas usando tratamentos específicos. Na presente investigação, dois padrões cinéticos de mediadores solúveis foram observados em pacientes com COVID-19.

Enquanto uma distribuição bimodal é observada no soro de pacientes com COVID-19, um pico unimodal em torno de D7 é observado na maioria dos biomarcadores solúveis em amostras de aspirado traqueal de pacientes críticos, corroborando a tempestade de citocinas divergente nos compartimentos sistêmico e das vias aéreas. As ferramentas de biologia de sistemas demonstraram ainda que o COVID-19 exibe redes de mediadores solúveis excêntricos distintos em comparação com os controles, com perfis opostos observados no soro e aspirados traqueais.

Independentemente do microambiente sistêmico ou compartimentalizado, as redes de pacientes que evoluíram para óbito estavam ligadas a um centro altamente integrado e pró-inflamatório/rico em fatores de crescimento. Por outro lado, os pacientes que evoluíram para alta apresentaram redes de arquitetura central fraca, com menor número de conexões de vizinhança e aglomerados de citocinas pró-inflamatórias e moléculas reguladoras. Em suma, esta investigação com tamanho de amostra robusto obteve um instantâneo abrangente das divergências sistêmicas e locais que mostraram claramente as distintas respostas imunes impulsionadas pelo SARS-CoV-2 desde a sua admissão de pacientes com COVID-19 grave.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARMINE CERAOLO, FEDERICO M GIORGI 2020; ZHOU P, Yang XL, Wang XG, et al., 2020. **Master Regulator Analysis of the SARS-CoV-2/Human Interactome**. doi: 10.3390/jcm9040982

Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al., 2019; **Clinical Features of Patients Infected With Novel Coronavirus in Wuhan, China**. *Lancet*. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5

N. PETROSILLO, G. VICECONTE, O. ERGONUL et al., 2021; **SARS and MERS:are they closely related**. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.03.026>

VRISHALI S SALIAN, JESSICA A WRIGHT, PETER T VEDELL et al., 2019; **COVID-19 Transmission, Current Treatment, and Future Therapeutic Strategies**. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00608

G. BECKER, T. MARTIN, A.N. SABO et al., 2021; **Impact of the COVID-19 pandemic on clinical research in hospitals: observational study in the first epicenter of the epidemic during the general lockdown in France**. doi: 10.26355/eurrev\_202101\_24686

SIDDIQI e MEHRA, et al., 2020; **COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical–therapeutic staging proposal**. doi: 10.1016/j.healun.2020.03.012

NICAS M, NAZAROFF WW, HUBBARD et al 2010; **A Toward understanding the risk of secondary airborne infection: emission of respirable pathogens**. doi: 10.1080/15459620590918466

World Health Organization. **Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Situation Report-51 (2020)**. Disponível em: [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf?sfvrsn=1ba62e57\\_10](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf?sfvrsn=1ba62e57_10)

RENAN SOUZA, DANIEL QUEIROZ et al., 2022; **SARS-CoV-2 Omicron BA.1, BA.2, and XAG identification during routine surveillance on a university campus in Belo Horizonte, Brazil, 2022.** doi: 10.1007/s42770-022-00848-5

BUTANTAN, **Avanço da ômicron faz casos de Covid-19 triplicarem no Brasil e quase dobrarem nas Américas em uma semana 2022; disponível em:** <https://butantan.gov.br/noticias/avanco-da-omicron-faz-casos-de-covid-19-triplicarem-no-brasil-e-quase-dobram-nas-americas-em-uma-semana>

Li S, JIANG L, LI X, LIN F, WANG Y, LI B, et al., 2020; **Clinical and Pathological Investigation of Patients With Severe COVID-19.** Doi: 10.1172/jci.insight.138070

GABRIEL MARTINO, **Probabilidade de surgir novas variantes mais perigosas da COVID-19 2021; disponível em** <https://ww3.icb.usp.br/estudo-aponta-alta-probabilidade-de-surgirem-novas-variantes-mais-perigosas-da-covid-19-nos-proximos-meses/>

CHRISTIAN LUKE D C BADUA, KAROL ANN T BALDO, PAUL MARK B MEDINA, 2020; **Genomic and proteomic mutation landscapes of SARS-CoV-2.** doi: 10.1002/jmv.26548

SHANG, J., WAN, Y., LUO C, et al., 2020; **Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2.** doi: 10.1073/pnas.2003138117

YANG, X.L., WANG, X.G, et al., 2020; **A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin.** doi:0.1038/s41586-020-2012-7.

DONOGHUE Mary; Hsieh Frank; BARONAS Elizabeth et al., 2020; **COVID-19: Fisiopatologia e Alvos para Intervenção Terapêutica.** doi: 10.21577/1984-6835.20200000

YA-DONG GAO, MEI DING, XIANG DONG et al., 2020; **Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: A review.** doi: 0.1111/all.14657. Epub 2020 Dec 4.

MINISTÉRIO DA SAUDE 2022, **BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO ESPECIAL: COVID-19**

Wiersinga J, Rhodes A, ALLEN C et al., 2020; **Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)**. doi:10.1001/jama.2020.12839

LI Q, GUAN X, WU P et al., 2020; **Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study**. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)

LIPPI G, PLEBANI, M et al., 2020; **Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. doi: [doi.org/10.1515/cclm-2020-0198](https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0198)

HUANG C, WANG Y, LI X., et al 2019; **Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China**. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)

SHEREEN, M. A.; KHAN, S. et al., 2020; **COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses**. doi: 10.1016/j.jare.2020.03.005. eCollection 2020 Jul

WHO Rapid Evidence Appraisal for COVID-19 Therapies (REACT) Working Group, JONATHAN A C, et al., 2020; **Association Between Administration of Systemic Corticosteroids and Mortality Among Critically Ill Patients With COVID-19: A Meta-analysis**. doi: 10.1001/jama.2020.17023

SIMONE BRANDÃO, EMANUELLE GODOI, JULIA RAMOS et al., 2020; **COVID-19 grave: entenda o papel da imunidade, do endotélio e da coagulação na prática clínica**. doi: 10.1590/1677-5449.200131

SIDDIQI e MEHRA et al., 2020; **COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical–therapeutic staging proposal**. doi:10.1016/j.healun.2020.03.012

SHANKAR-HARI M, VALE CL, GODOLPHIN PJ et al.,2020; **In patients hospitalized for COVID-19, tocilizumab reduces mortality**. doi:10.7326/ACPJ202111160-125

EL PAÍS CIÊNCIA 2020; DINAMARCA SACRIFICARÁ 17 MILHÕES DE ANIMAIS PARA CONTER VARIANTE DO CORONAVÍRUS QUE INFECTOU HUMANOS.

PUJA MEHTA & DAVID FAJGENBAUM, 2021; **Is severe COVID-19 a cytokine storm syndrome: a hyperinflammatory debate**. doi: 0.1097/BOR.0000000000000822

FAJGENBAUM & JUNE 2020; **Cytokine Storm. N Engl J Med**. doi:10.1056/NEJMra2026131

JOSE RJ & MANUEL A, 2020; **Cytokine Storm: The Interplay Between Inflammation and Coagulation**. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30216-2

REYNOLDS D, VAZQUEZ C et al., 2021; **Comprehensive Immunologic Evaluation of Bronchoalveolar Lavage Samples From Human Patients With Moderate and Severe Seasonal Influenza and Severe Covid-19**. doi: 10.4049/jimmunol.2100294

HENDERSON LA, et al. 2020; **On the Alert for Cytokine Storm: Immunopathology in COVID-19. Arthritis Rheumatol (2020)**. doi: 10.1002/art.41285

ABBAS A, LICHTMAN A, PILLAI S et al., 2021; **Imunologia celular e molecular Elsevier**; V. 2015, p. 27-99, p. 138-209, p. 439-469

RAGAB D, HAITHAM E et al., 2020; **The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far**. doi: 10.3389/fimmu.2020.01446. eCollection 2020.

ANA ALBURQUERQUE et al., 2021; **Radiological Images In Covid-19: An Integrative Review**. doi: <https://doi.org/10.14295/aimj.v4i8.108>

LIESL HAGAN, MPH DAVID W. MCCORMICK et al., 2020; **Outbreak of SARS-CoV-2 B.1.617.2 (Delta) Variant Infections Among Incarcerated Persons in a Federal Prison.** doi:<http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm7038e3>

PHILIP MAFFETOBNE, PAUL LAUSEN 2020; **The Perfect Storm: Coronavirus (Covid-19) Pandemic Meets Overfat Pandemic.** doi:10.3389/fpubh.2020.00135

YI-WEI TANG, A JONATHAN E, SCHMITZ, et al., 2020; **Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges.** doi: 0.1128/JCM.00512-20

**DETALHAMENTO DO PROTOCOLO DE UTILIZAÇÃO DE TESTES RÁPIDOS PARA COVID-19 E MANEJO DOS PACIENTES SUSPEITOS E CONFIRMADOS COM SARS-COV-2;** disponível em:  
[https://www.arapongas.pr.gov.br/downloads/covid19/detalhamento\\_testes\\_rapidos.pdf](https://www.arapongas.pr.gov.br/downloads/covid19/detalhamento_testes_rapidos.pdf)

BLANCO-MELO et al., 2020; **Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19.** *Cell* (2020). doi: 10.1016/j.cell.2020.04.026

VERAS et al., 2020; **Sars-CoV-2-triggered Neutrophil Extracellular Traps Mediate.** doi: 10.1084

ESTA et al., 2022; **The Role of Interleukin-8 in Lung Inflammation and Injury: Implications for the Management of COVID-19 and Hyperinflammatory Acute Respiratory Distress Syndrome.** doi: 10.3389

CHEN N, ZHOU M, DONG X, QU J, GONG F, HAN Y et al., 2020; **Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China.** doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7

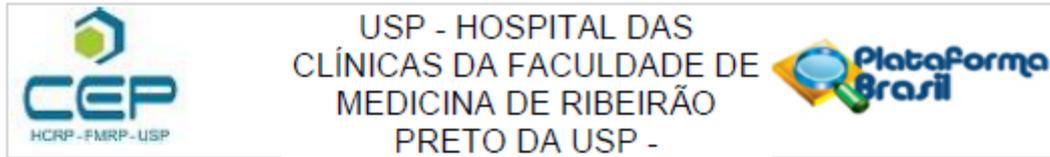
HERMINE et al., 2020; **Tocilizumab plus dexamethasone versus dexamethasone in patients with moderate-to-severe COVID-19 pneumonia: A randomised clinical trial from the CORIMUNO-19 study group.** doi: 10.1016/j.eclinm.2022.101362

DEL VALLE et. al., 2021; **An Inflammatory Cytokine Signature Predicts COVID-19 Severity and Survival.** doi: 10.1038/s41591-020-1051-9

PAIRO-CASTINERA et al., 2020; OLIVEIRA-PAIM et al., 2021; **Genetic Mechanisms of Critical Illness in COVID-19.** doi: 10.1038/s41586-020-03065-

## ANEXOS

### ANEXO I - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Participação do Sistema Renina Angiotensina na fisiopatologia da infecção humana pelo novo coronavírus (COVID-19)

**Pesquisador:** CHRISTIANE BECARI

**Área Temática:**

**Versão:** 7

**CAAE:** 30816620.0.0000.5440

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.657.669

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda ao projeto de pesquisa conforme carta datada de 12 de Abril de 2021.

##### Resumo:

A atual pandemia é decorrente da infecção humana pelo novo coronavírus (Sars-Cov-2), que causa a doença COVID-19. O vírus é transmitido principalmente por meio de gotículas, secreções respiratórias e contato direto. Seus principais sintomas são febre, tosse, cefaleia e, raramente, hiperêmese e diarreia. Pacientes idosos que apresentam comorbidades tais como hipertensão, diabetes, doenças pulmonares, cardíacas, renais, apresentam uma taxa de mortalidade mais elevada, podendo chegar a 20,2% em idosos acima de 80 anos. Dados da literatura médica mostraram que a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2) é o receptor funcional do vírus Sars-Cov-2, responsável pela COVID-19. A ECA-2 é expressa no sistema gastrointestinal, coração, rim e nos pulmões, e é uma enzima do sistema renina angiotensina (SRA) responsável pela formação de angiotensina (Ang) 1-9 e Ang-1-7. Acredita-se que dois eixos principais modulam o SRA: um eixo composto por enzima conversora de angiotensina (ECA), Ang II e receptor AT1 (AT1R), e outro eixo composto por ECA-2, Ang 1-7 e o receptor MAS. A ECA-2 atua principalmente contrabalançando o efeito da ECA. O uso de drogas classicamente utilizadas para tratamento de hipertensão e outras doenças relacionadas ao SRA como os

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.049-900  
 UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO  
 Telefone: (16)3802-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DE RIBEIRÃO  
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 4.657.669

inibidores da ECA (iECA) e antagonistas dos AT1R podem aumentar a expressão de ECA-2 e, assim, talvez aumentar a suscetibilidade do paciente

à entrada e propagação de células hospedeiras virais. Ainda não está claro se a utilização dos iECA ou antagonista do AT1R pode diminuir ou agravar lesões pulmonares causadas pelo novo coronavírus. Portanto, o significado da expressão de ECA-2 e dos componentes do SRA na patogênese, na gravidade e mortalidade de COVID-19 ainda não é completamente conhecido. Estudos mostraram que o Sars-Cov-2, após se ligar a ECA-2, induz lesão celular inicialmente pelo efeito citopático viral direto e, sequencialmente, danos adicionais são causados pela ativação intensa das citocinas inflamatórias. Em conjunto, o presente projeto pretende investigar quais alterações ocorrem no SRA, nos mediadores inflamatórios, nas metaloproteinases, no óxido nítrico e nas micropartículas em pacientes não graves e graves infectados pelo COVID-19. Além de avaliar se a utilização prévia e crônica dos inibidores do SRA (inibidores da ECA e antagonistas do receptor AT1 de angiotensina) podem interferir na evolução clínica da doença e no perfil do componentes do SRA, mediadores inflamatórios, metaloproteinases, óxido nítrico e micropartículas em pacientes menos graves e graves internados com COVID-19 no Hospital da Clinicas de Ribeirão Preto-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (HCRP-FMRP-USP).

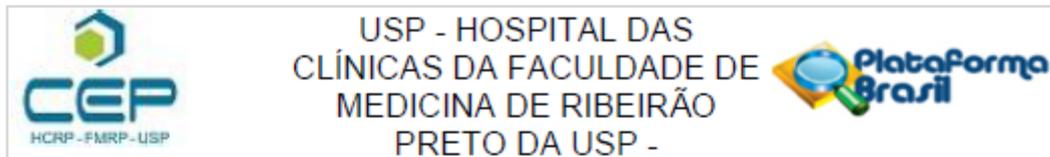
**Hipótese:**

A ligação do vírus SARS-Cov-2 à enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2) diminui a atividade desta enzima, levando ao desbalanço no sistema renina angiotensina o que resultaria na diminuição do eixo vasodilatador (ECA2/Angiotensina1-7/ receptor MAS) e aumento do eixo vasoconstritor (ECA/AngiotensinII/receptor de angiotensina AT1), favoreceria a inflamação, e reduziria a liberação de óxido nítrico e aumentaria as metaloproteinases. Essas alterações favoreceriam a lesão pulmonar, o que resultaria no agravamento da condição clínica do paciente com COVID19.

**Justificativa da Emenda:**

Ribeirão Preto, 12 de Abril de 2021 Ilma. Dra. MÁRCIA GUIMARÃES VILLANOVA Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP. Ref.: Carta de emenda ao CEP Venho por meio desta solicitar ao Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP e da FMRP-USP a inserção dos membros Vinicius Flora Dugaich (431.965.428-58), Daniely Franco Francisco (373.273.658-00), Juliano Vilela Alves (CPF: 690.906.101-20), Rafael Menezes da Costa (CPF: 036.930.781-06), Josiane

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO  
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.657.669

Fernandes Silva (CPF: 075.110.136-27), Mirele Resende Machado (CPF: 040.010.261-71), Daniel Rodrigues (CPF: 428.908.568-79) como parte da equipe do projeto de pesquisa "Participação do Sistema Renina Angiotensina na fisiopatologia da infecção humana pelo novo coronavírus (COVID-19)" na plataforma Brasil. Ressalto que nenhuma outra alteração foi realizado no corpo do projeto, somente a inclusão dos pesquisadores citados acima na nova versão 7. Cordialmente, Dra. Christiane Becari Laboratório de Doenças Cardiovasculares e Função Endotelial Departamento de Cirurgia e Anatomia FMRP-USP.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Comparar os componentes do sistema renina angiotensina, mediadores inflamatórios, metaloproteinases, nitrito e nitratos e micropartículas em pacientes menos graves e graves internados com COVID-19 no Hospital da Clinicas de Ribeirão Preto- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (HCRP-FMRP-USP).

**Objetivo Secundário:**

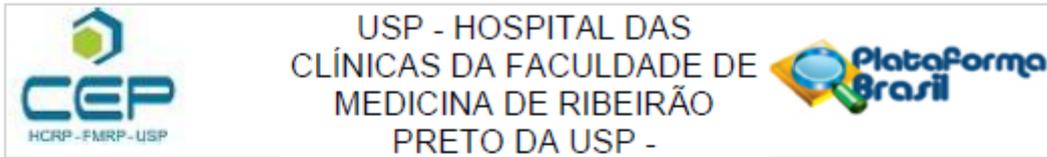
1. Analisar os dados clínicos, demográficos e variáveis respiratórias e cardiovasculares em pacientes menos graves e graves internados com COVID19 no HCRP-FMRP-USP.2. Investigar os componentes do sistema renina angiotensina, (renina, ECA, ECA-2, aldosterona, carboxipeptidases e os peptídeos Ang II, Ang 1-7, Ang I, Ang IV, Ang 1-9) nos pacientes menos graves e graves internados com COVID-19 no HCRP-FMRP-USP. 3. Avaliar se a utilização prévia e crônica dos inibidores do SRA (inibidores da ECA e antagonistas do receptor AT1 de angiotensina) interferem na evolução clínica e nos componentes do SRA nos pacientes menos graves e graves com COVID-19 atendidos no HCRP-USP. 4. Quantificar a ECA-2 plasmática e relacionar com a gravidade dos pacientes internados com COVID-19 no HCRP-FMRP-USP. 5. Avaliar os mediadores inflamatórios e fatores de crescimento no plasma dos pacientes menos graves e graves internados com COVID-19 no HCRP-FMRP-USP. 6. Avaliar as metaloproteinases e nitritos e nitratos no plasma dos pacientes menos graves e graves internados com COVID-19 no HCRP-FMRP-USP. 7. Realizar análise fenotípica das micropartículas para determinação da sua origem celular nos pacientes menos graves e graves com COVID-19 atendidos no HCRP-USP.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Os riscos esperados envolvem o manuseio de dados de identificação dos participantes e com

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO			
Bairro: MONTE ALEGRE	CEP: 14.048-900		
UF: SP	Município: RIBEIRAO PRETO		
Telefone: (16)3602-2228	Fax: (16)3633-1144	E-mail: cep@hcrp.usp.br	



Continuação do Parecer: 4.657.669

relação a coleta de sangue. Quanto ao primeiro serão tomadas todas as medidas para se preservar o sigilo e a confidencialidade dos dados. Os dados serão acessados apenas pelos pesquisadores cadastrados e todas as formas de comunicação científica dos resultados previstas não levarão qualquer dado que possa identificar algum participante. Quanto à coleta de sangue, poderá ocorrer dor local ou formação de hematoma. Para diminuir estes riscos, funcionários experientes (técnicos de pesquisa, laboratório e enfermeiras) realizarão as coletas.

**Benefícios:**

Os pacientes que participarão desse estudo irão contribuir para o entendimento da doença e nortear o tratamento de COVID-19, visto que na literatura ainda não existem tratamentos preconizados com nível de evidência robusto.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

**Metodologia Proposta:**

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL GERAL** Serão consultados através de prontuário eletrônico a história clínica, sinais vitais como pressão arterial e frequência cardíaca, frequência respiratória, saturação de oxigênio por oximetria de pulso, a relação do PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>, avaliação de falência de órgãos pelo score SOFA (variando de 0 a 4, onde 4 é a pior evolução), raio X de tórax, tomografia de tórax e exames laboratoriais como hemograma, proteína C reativa, gasometria arterial, enzimas hepáticas, glicose, eletrólitos, uréia, creatinina, bilirrubinas, albumina, ferritina, dímeros D, TP, TTPA, fibrinogênio, culturas de prováveis focos infecciosos, dosagem de componentes do SRA (Ang II, Ang 1-7, renina, aldosterona, ECA, ECA-2), mediadores inflamatórios (perfil inflamatórios) nitritos e nitratos, fatores de coagulação e crescimento, atividade das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) e micropartículas. Além disso, será realizada a análise da proporção de pacientes que progredem para cura ou morte, frequência de efeitos adversos, medicação utilizada. Todas essas medidas serão realizadas no dia da internação (dia 1), 7 dias e 14 dias de internação ou alta/óbito em todos os pacientes participantes do estudo **ANÁLISES LABORATORIAIS ESPECÍFICAS:** As análises laboratoriais específicas serão realizados pelo grupo da Profa Dra. Christiane Becari. O espaço físico do laboratório de biossegurança 3 do Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto sera utilizado para processar o aspirado. As amostras de sangue, urina e aspirado serão processados e armazenados em biorepositorio. **Coleta de Sangue:** será realizada através de veia periférica (10mL) que serão distribuídos em alíquotas: 1- tubos os plásticos contendo citrato de sódio (2mg/mL de sangue, para as análises do SRA), 2- tubo contendo EDTA (fenotipagem linfocitária -

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
 UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO  
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DE RIBEIRÃO  
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 4.657.669

hemograma), 3- Dosagens bioquímicas de rotina através de ensaios padronizados incluindo glicemia, ureia, creatinina e provas de atividade inflamatória. O sangue será centrifugado a 1000xg, por 15 minutos, a temperatura ambiente, e o plasma/soro armazenado a -700C até o momento das análises. Deve-se ressaltar que todas as amostras serão processadas em laboratório com nível de biossegurança 2. Serão realizadas diferentes abordagens laboratoriais para entender as alterações que a COVID-19 induz nos pacientes. Para caracterizar a participação dos diferentes componentes do SRA através de análises de atividade da ECA, ECA-2, renina, radioimunoensaio (ELISA) para Ang II, Ang 1-7 e mediadores inflamatórios e proteases de coagulação, zimografia para quantificar as metaloproteinasas, análise do nitrito e nitrato para avaliar se a infecção altera a via do óxido nítrico. Atividade da ECA: A atividade da ECA plasmática será determinada pelo método fluorimétrico (LEITE; SALGADO, 1992), utilizando Hip-His-Leu como substrato. Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA): Serão analisados os mediadores inflamatórios (ncluem EGF, IFNy, interleucina (IL)-1alfa, IL-1B, IL-1RA, IL-2, IL3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A IL-1B, MIP-1B, TNFa,TNFb, TGfalfa, MIP-1a/CCL3, MIP-1b/CCL4, MCP) e fatores de crescimento VEGF, FGFbasic, PDGF, GM-CSF e G-CSF), no plasma por ELISA. O protocolo será feito conforme instrução dos kits de quantificação (RnD System). Esses

citocinas e quimiocinas foram escolhidas por estarem relacionadas com o processo inflamatória em geral. Além disso, queremos entender uma possível relação entre esses mediadores e o SRA em pacientes infectados com COVID-19. A concentração de Ang II, Ang 1-7, renina também serão quantificados no plasma conforme instrução da fabricante dos conjuntos de ELISA (Cayman e US biological, respectivamente).Quantificação de Metaloproteinasas por Zimografia: A quantificação das metaloproteinasas será realizada em plasma obtidas de pacientes através da técnica de zimografia. Quantificação de óxido nítrico: será feita a quantificação de nitratos (NO<sub>3</sub>-) e nitritos (NO<sub>2</sub>) através do método de quantificação indireta do NO.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos da emenda foram devidamente apresentados ao CEP.

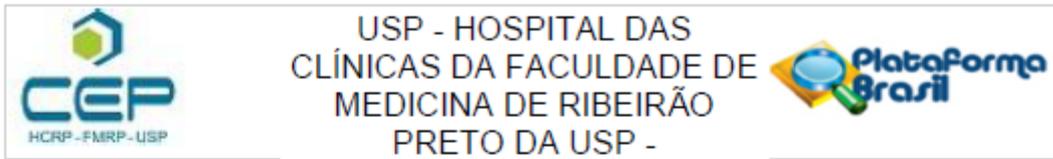
**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O CEP analisou e aprovou a emenda referente a inclusão de pesquisadores bem como o Projeto de pesquisa- versão 7 data 12/04/2021.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO  
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.657.669

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_1734402_E5.pdf	12/04/2021 14:15:45		Aceito
Outros	CartaemendaCEP_ProjetoSRA_COVID_v7_12_04_2021.pdf	12/04/2021 14:14:46	CHRISTIANE BECARI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCovid_SRA_Comitedeetica12_04_20versao7.pdf	12/04/2021 14:14:19	CHRISTIANE BECARI	Aceito
Outros	Termo_de_Concordancia_USPRP_ZELIA.pdf	17/12/2020 13:38:10	MARIA AUXILIADORA MARTINS	Aceito
Outros	Termo_de_anuencia_USPRP_SHEILA.pdf	15/12/2020 16:35:17	MARIA AUXILIADORA MARTINS	Aceito
Outros	Termo_de_Anuencia_USPRP_Andrea.pdf	15/12/2020 16:35:01	MARIA AUXILIADORA MARTINS	Aceito
Outros	Termo_de_anuencia_USPRP_OLINDO.pdf	15/12/2020 16:32:39	MARIA AUXILIADORA MARTINS	Aceito
TCLÉ / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termocombiorepositorio_COVID19SRA_20_08_20_v4.pdf	21/08/2020 12:31:03	CHRISTIANE BECARI	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO_DA_PESQUISA_Covid_PLataformaBrasil08052020.pdf	12/05/2020 17:01:45	CHRISTIANE BECARI	Aceito
Folha de Rosto	FR10990.pdf	17/04/2020 13:28:46	CHRISTIANE BECARI	Aceito
Orçamento	UPC_COVID_SRA_ASSINADO_ABRIL.pdf	15/04/2020 13:33:01	CHRISTIANE BECARI	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_ATIVIDADES_COVID19_SRA.pdf	09/04/2020 11:13:54	CHRISTIANE BECARI	Aceito

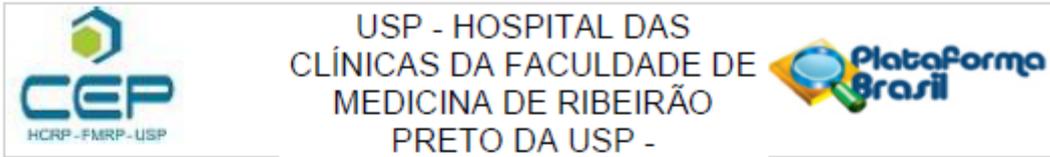
**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
 UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO  
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.657.669

RIBEIRAO PRETO, 19 de Abril de 2021

---

Assinado por:  
**MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
(Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO  
Telefone: (16)3802-2228 Fax: (16)3833-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

## ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO

**Título da pesquisa:** “Participação do Sistema Renina Angiotensina na fisiopatologia da infecção humana pelo novo coronavírus (COVID-19)”

**Pesquisadores responsáveis:**

- Profa. Dra. Maria Auxiliadora Martins, Divisão de Medicina Intensiva, Departamento de Cirurgia e Anatomia, Hospital das Clínicas da FMRP-USP - Telefone de contato: (16)3602-2439 ou (16) 98126-8570;
- Profa. Dra. Christiane Becari, Departamento de Cirurgia e Anatomia, Hospital das Clínicas da FMRP-USP - telefone de contato: (16)3602-3297 e (16) 98129-8433.

O (a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte deste estudo, assine ao final deste documento em duas vias. Caso o(a) senhor(a) não aceite participar da pesquisa, não será penalizado(a) de forma alguma e seu atendimento não será prejudicado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP).

O objetivo da pesquisa é entender melhor como acontece a doença pelo novo coronavírus, chamada de COVID-19, e como ela altera diferentes partes do Sistema Renina Angiotensina (SRA), que age em nosso sangue para controlar nossa pressão arterial e também altera nossa saúde de várias formas, como agindo em nossos pulmões, rins e vasos sanguíneos (artérias e veias). Caso concorde em participar, o (a) senhor (a) nos permitirá coletar sangue, por volta de 20mL (2 colheres de sopa), urina (10ml) e secreção das vias respiratórias (pequena quantidade de secreção proveniente dos pulmões). Esta última será coletada através de aspiração pelo tubo traqueal, apenas para pacientes em ventilação mecânica (respiração através de aparelho), durante os cuidados respiratórios diários. Este material será coletado preferencialmente durante a coleta de sangue para os exames de rotina definidos pela equipe médica que o (a) avalia diariamente, ou seja, não haverá, provavelmente a necessidade de tomar picadas de agulha a mais. A coleta de sangue será feita a partir de uma veia do seu braço, no momento da internação, outra daqui a 2, daqui a 7 e daqui a 14 dias. Em seu sangue e urina vamos dosar substâncias que nos falam sobre a presença de lesão nos vasos sanguíneos, no pulmão e sobre inflamação no corpo. Essas substâncias são o óxido nítrico, metaloproteinases e componentes do sangue responsáveis pela coagulação (sistema que controla o sangramento). Além

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_  
 Rubrica do participante/responsável \_\_\_\_\_

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Guarda de Material Biológico  
 versão 3 data 20/08/20

disso, teremos acesso às informações sobre seu estado de saúde todos os dias. Para isso, consultaremos seu prontuário médico, para verificar as anotações feitas pela equipe médica que avalia o (a) senhor (a) todos os dias e seus exames laboratoriais.

Vamos fazer as coletas enquanto o (a) senhor (a) estiver internado ou em consulta médica, então o(a) senhor(a) não gastará nada para participar deste projeto. Como possíveis riscos de sua participação no estudo, a coleta de sangue poderá causar uma dor leve e pode deixar um hematoma (marca roxa) no local da picada. Funcionários experientes do local (técnicos de pesquisa, laboratório e enfermeiras) realizarão coletas de sangue para diminuir este risco. Os investigadores e o pessoal do estudo estão empenhados em assegurar a confidencialidade e a privacidade dos seus dados pessoais da pesquisa, de acordo com as regras do Brasil. Seu nome será substituído por um código numérico especial de identificação do participante (NIP). O código será usado em todas as suas amostras e documentos do estudo para proteger a sua identidade. A conexão entre seu código e seu nome será guardada em local trancado, localizado no centro do estudo, e separado de seu prontuário. Os arquivos em papel também serão mantidos em local guardado a chaves dentro do centro da pesquisa. Os arquivos eletrônicos serão protegidos por senhas. O acesso a todas as informações do estudo ficará limitado às pessoas que trabalham no estudo. Nenhum dado escrito ou publicado sobre este estudo mencionará seu nome.

Essa pesquisa não trará benefício direto para o (a) senhor (a) e não haverá qualquer valor econômico, a receber ou a pagar, pela sua participação. Porém os benefícios esperados dessa pesquisa são um melhor entendimento da doença COVID-19 e assim poderá ajudar no desenvolvimento de um tratamento desta doença, o que ainda não existe. Assim, esperamos que a sociedade será beneficiada com este estudo com sua ajuda

Sua participação nesta pesquisa é voluntária e o (a) senhor (a) tem liberdade de deixar de participar a qualquer momento, é só avisar algum dos pesquisadores. Caso não aceite participar o seu tratamento no hospital será o mesmo.

Será mantido sigilo absoluto dos dados obtidos individualmente neste estudo, para assegurar a privacidade dos participantes. Caso o (a) senhor (a) se sinta prejudicado em participar desta pesquisa, o(a)senhor(a) poderá buscar indenização de acordo com as normas vigentes no país.

Os pesquisadores estarão disponíveis para qualquer dúvida a qualquer momento durante o estudo e o sr. (a) tem a garantia de acesso aos resultados da pesquisa.

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_  
Rubrica do participante/responsável \_\_\_\_\_

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Guarda de Material Biológico  
versão 3 data 20/08/20

Esta pesquisa está vinculada ao biorrepositório denominado: “Participação do Sistema Renina Angiotensina na fisiopatologia da infecção humana pelo novo coronavírus (COVID-19)”. Neste biorrepositório serão armazenadas amostras de sangue e urina, até a realização dos testes do estudo.

As amostras de secreção respiratória serão processadas e armazenadas, até o momento das análises, no laboratório de virologia da FMRP-USP (certificado de biossegurança-3). Estas amostras de secreção respiratória serão utilizadas exclusivamente para este estudo não havendo retenção para pesquisas futuras.

As suas amostras não serão vendidas ou usadas diretamente para a produção de produtos comerciais. As amostras serão armazenadas por dez anos. No futuro, se um pesquisador desejar fazer um novo estudo nas amostras guardadas no biorrepositório, ele ou ela deverá redigir um projeto, que passará pela análise e aprovação dos membros do estudo, pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEP-HCFMRP-USP) e, se necessário, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Brasil (CONEP). O biorrepositório ficará localizado no endereço abaixo:

Laboratório de Doenças Cardiovasculares, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, Bloco C, Campus Universitário - Monte Alegre Ribeirão Preto – SP/CEP: 14049-900

Responsável: Profa. Dra Christiane Becari; Telefone: (16) 3315-3297.

O horário de funcionamento do Laboratório é de segunda a sexta-feira, das 08:00 às 18:00h.

#### **AUTORIZAÇÃO PARA ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA**

**Leia cuidadosamente a declaração abaixo e escreva as suas iniciais no espaço apropriado.**

Dou permissão para que as minhas amostras de sangue e urina sejam armazenadas para uso em estudos futuros aprovados pelas agências brasileiras de regulação CEP/CONEP.

SIM  NÃO  \_\_\_\_\_ Iniciais

Solicitamos também os dados de contato do (a) senhor (a), para que seja possível encontrá-lo(a) posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse, além de receber eventuais benefícios provenientes do estudo com seu material biológico. Também solicitaremos sua autorização, se necessário, para o descarte do material armazenado caso tenhamos feito toda a pesquisa pretendida em menos de dez anos, ou o interesse de pesquisa nessa área se esgote.

Declaramos para os devidos fins que a cada nova pesquisa o Sr. (a) será contatado para a utilização do seu material biológico armazenado neste biorrepositório, e também a nova pesquisa será

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_  
Rubrica do participante/responsável \_\_\_\_\_

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Guarda de Material Biológico  
versão 3 data 20/08/20

submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Caso tenha dúvidas sobre aspectos éticos desta pesquisa, o (a) senhor (a) também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é composto por um grupo de pessoas que são responsáveis por supervisionarem pesquisas em seres humanos que são realizadas na instituição e tem a função de proteger e garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos os participantes de pesquisa que se voluntariam a participar da mesma. O CEP do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto é localizado no subsolo do hospital e funciona de segunda a sexta-feira, das 8:00 às 17:00hs, telefone de contato (016) 3602-2228.

Solicitamos seus dados de contato e sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de participação. Também afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada e rubricada, será entregue ao senhor.

Eu li este termo de consentimento livre e esclarecido (ou me explicaram esse termo), todas as minhas dúvidas/perguntas foram esclarecidas e eu concordo em participar deste estudo.

**Dados do participante:**

Nome: \_\_\_\_\_, RG: \_\_\_\_\_,  
Endereço: \_\_\_\_\_, nº \_\_\_\_\_,  
Bairro \_\_\_\_\_, cidade \_\_\_\_\_, telefone \_\_\_\_\_

Abaixo também seguem os dados de contato do pesquisador responsável, caso o (a) senhor (a) tenha alguma dúvida posteriormente.

**Nome do participante:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_ **data:** \_\_\_\_\_

**Nome do pesquisador:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_ **data:** \_\_\_\_\_

**Dados do responsável legal ou testemunha (caso aplicável):**

Nome legível: \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_ **data:** \_\_\_\_\_

Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_  
Rubrica do participante/responsável \_\_\_\_\_