



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**CAROLINE NOBRE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE ARMADILHAS EXTRACELULARES DE  
NEUTRÓFILOS NO DESFECHO CLÍNICO DE PACIENTES COM COVID-19  
GRAVE**

**FORTALEZA**

**2022**

**CAROLINE NOBRE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE ARMADILHAS EXTRACELULARES DE  
NEUTRÓFILOS NO DESFECHO CLÍNICO DE PACIENTES COM COVID-19  
GRAVE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Médica

Orientador: Prof. Dra. Juliana Navarro Ueda Yachite.

**FORTALEZA**

**2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- O46a Oliveira, Caroline Nobre.  
Avaliação de marcadores de armadilhas extracelulares de neutrófilos no desfecho clínico de pacientes com COVID-19 grave / Caroline Nobre Oliveira. – 2023.  
102 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2023.  
Orientação: Profa. Dra. Juliana Navarro Ueda Yaochite.
1. COVID-19. 2. SARS-CoV-2. 3. Neutrófilos. 4. Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos. I. Título.  
CDD 616.9
-

**CAROLINE NOBRE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE ARMADILHAS EXTRACELULARES DE  
NEUTRÓFILOS NO DESFECHO CLÍNICO DE PACIENTES COM COVID-19  
GRAVE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia médica.

Aprovada em: 30/11/2022.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Juliana Navarro Ueda Yaochite (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso  
Universidade de São Paulo (USP)

---

Prof. Dr. Tarcio Teodoro Braga  
Universidade de São Paulo (USP)

Aos meus pais, Allan e Solange, e à minha irmã,  
Vivi, por todo amor e apoio em cada passo  
dado.

A todos os profissionais de saúde que doaram a  
vida na pandemia da COVID-19.

A todas as vítimas da COVID-19 e suas  
famílias.

## AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora pela permissão, condução, força e amor a cada dia, por estarem comigo.

Aos meus amados pais, Allan e Solange, e irmã, Vivi, por serem inspiração, incentivo, suporte, direção, lar, meus grandes tesouros desta vida.

Aos meus padrinhos, Tia Sandra e Tio Marcelo, por todo o apoio e cuidado nestes dois anos morando ao lado. A toda minha amada família.

À minha orientadora, Dra. Juliana Ueda, por todo acolhimento e ensinamentos passados. Obrigada por me mostrar a face encantadora da imunologia. Sou uma admiradora da sua forma de ensinar!

À Mariella Maciel, minha inicialmente mentora, e hoje amiga. Obrigada por estar comigo desde o começo dessa jornada. Obrigada pelo apoio em cada direcionamento, dúvida esclarecida e ensinamentos.

À minha colega de bancada, Lucyana Carrijo, por toda a ajuda, apoio e parceria em cada etapa do mestrado. Sua presença tornou tudo mais leve.

Ao farmacêutico Raphael Rodrigues, por todo apoio na execução experimental, por cada ensinamento transmitido.

A todos os membros do LIMCEMO pelo acolhimento, suporte e contribuição neste trabalho e durante todo o mestrado: Artur Fontenelle, Wilker Gotay, Catharina Diniz, Alan Gleison, Bianca e Lucas.

Aos professores, Dra. Aparecida Nagao, Dra. Alice Martins, Dr. Fernando Schemelzer, Dr. Alexandre Havt, Dr. Marco Clementino e membros dos respectivos laboratórios, pela ajuda e disponibilização dos espaços e dos equipamentos para a realização dos experimentos.

À Dra. Polianna Albuquerque e Dra. Sandra Mota e toda equipe do IJF pelo acolhimento, contribuição com as amostras e dados coletados.

A todos os docentes do PPGMM, pela transmissão de tantos conhecimentos, incentivo e amor pela Microbiologia Médica. Obrigada por estes anos de amadurecimento e construção de pensamento crítico no ensinar e no aprender.

A todos os discentes do PPGMM. Agradeço e parabeno pela dedicação em cada disciplina, apresentação e trabalhos realizados.

À Dani, Fabi, Letícia, Seu Ricardo, Elita, Talita, e todos que trabalham nos departamentos, nos ajudando sempre que necessário.

À JBS pelo financiamento deste trabalho.

À FUNCAP, pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal do Ceará, instituição que tive a honra de fazer parte.

Aos amigos Bia e Andressa, Natally e Felipe pela amizade, companheirismo, torcida, por estarmos juntos na caminhada da vida. A amizade cuja fonte é Deus nunca se esgota.

Aos meus amados irmãos da Obra Lumen, por sempre serem casa seja em Natal ou em Fortaleza.

Sozinhos nada podemos.



*“Os benefícios da ciência não são para os cientistas, e, sim, para a humanidade.”*

**Louis Pasteur**

## RESUMO

Os casos graves da COVID-19, doença causada pelo SARS-CoV-2, podem evoluir para Síndrome Respiratória Aguda Grave, falência múltipla dos órgãos e óbito, sendo necessário o suporte das unidades de terapia intensiva (UTI). Estudos relatam diferentes fatores de mau prognóstico para esta parcela dos indivíduos infectados. Após três meses da declaração da COVID-19 como pandemia, foi relatada a presença de níveis elevados de constituintes das Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs) em pacientes com a doença. NETs são um mecanismo da imunidade inata, no qual sua produção excessiva ou sua eliminação diminuída estão envolvidas na imunopatogênese de doenças inflamatórias. Poucos estudos avaliaram a influência das NETs no desfecho clínico da COVID-19. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência de marcadores de NETs, assim como do perfil sociodemográfico e laboratorial, no desfecho clínico de pacientes com COVID-19 grave internados em UTI de um hospital de referência de Fortaleza/CE, em períodos de aumento de casos em 2020 e 2021. Foram utilizadas 78 amostras de plasma, coletadas no momento da admissão na UTI, para investigação dos marcadores mieloperoxidase (MPO), elastase neutrofílica (EN), histona H3 citrulinada (H3Cit) e DNA livre de células (cfDNA), a partir de método imunoenzimático e fluorimetria. Dos 78 pacientes, 40 (51,2%) foram a óbito durante a internação e 38 (48,8%) tiveram desfecho clínico de alta hospitalar. Um total de 50 (64,1%) eram do sexo masculino e 28 (35,9%) do sexo feminino. Os pacientes que foram a óbito eram mais velhos (mediana: 69,50; IQR: 55-76), apresentaram menor concentração de plaquetas (mediana:  $193,5 \times 10^3/\text{mm}^3$ ; IQR:  $154-278 \times 10^3/\text{mm}^3$ ) e maior relação neutrófilo/linfócito (NLR) (mediana: 12,79; IQR: 9,21-21,44) quando comparados com os que receberam alta. Dos quatro marcadores indicativos de NETs dosados, três deles (MPO, H3Cit e cfDNA) estavam mais elevados ( $p < 0,05$ ) no grupo de óbito em comparação com os que evoluíram para alta. Houve correlação significativa ( $p < 0,05$ ) positiva forte entre EN e MPO ( $r = 0,8561$ ), correlação positiva moderada entre H3Cit e MPO ( $r = 0,4075$ ), e MPO e cfDNA ( $r = 0,4965$ ). Correlações positivas fracas foram encontradas entre EN e cfDNA, H3Cit e EN, H3Cit e cfDNA. Além disso, MPO e EN apresentaram correlação com NLR ( $r = 0,2430$ ,  $r = 0,3029$ ) e neutrófilos ( $r = 0,3074$ ,  $r = 0,2858$ ). Dessa forma, os maiores níveis de marcadores de NETs em pacientes que foram a óbito e as correlações encontradas entre eles apontam para a contribuição desse mecanismo no agravamento da COVID-19 a um desfecho desfavorável, devendo ser estudado como estratégia terapêutica nos indivíduos infectados com a forma grave da doença, melhorando, assim, o seu prognóstico.

**Palavras-chave:** COVID-19. SARS-CoV-2. Neutr3filos. Armadilhas Extracelulares de Neutr3filos.

## ABSTRACT

Severe cases of COVID-19, a disease caused by SARS-CoV, can progress to Severe Acute Respiratory Syndrome, multiple organ failure and death, requiring Intensive Care Units (ICUs) support. Studies report different factors of poor prognosis for this portion of the infected. Three months after the declaration of COVID-19 as a pandemic, the presence of elevated levels of constituents of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) was reported in patients with the disease. NETs are a mechanism of innate immunity, in which their excessive production or their decreased elimination are involved in the immunopathogenesis of inflammatory diseases. Few studies have evaluated the influence of NETs on the clinical outcome of COVID-19. Thus, the aim of this study was to evaluate the influence of NETs markers, as well as the sociodemographic and laboratory profile, on the clinical outcome of patients with severe COVID-19 admitted to the ICU of a reference hospital in Fortaleza/CE, in increased cases periods in 2020 and 2021. A total of 78 plasma samples, from ICU admission, were used for the investigation of myeloperoxidase (MPO), neutrophil elastase (NE), citrullinated histone H3 (H3Cit) and cell-free DNA (cfDNA), using enzyme immunoassay and fluorimetry. Of the 78 patients, 40 (51.2%) died during hospitalization and 38 (48.8%) had a clinical outcome of hospital discharge. A total of 50 (64.1%) were male and 28 (35.9%) were female. Patients who died were older (median: 69.50; IQR: 55-76), had lower platelet concentrations (median:  $193.5 \times 10^3/\text{mm}^3$ ; IQR:  $154-278 \times 10^3/\text{mm}^3$ ) and higher neutrophil/lymphocyte ratio (NLR) (median: 12.79; IQR: 9.21-21.44) when compared to discharged patients. Of the four markers indicative of NETs measured, three of them (MPO, H3Cit and cfDNA) were higher ( $p < 0.05$ ) in the death group compared to the discharged group. There was a significant correlation ( $p < 0.05$ ) strong positive between NE and MPO ( $r = 0.8561$ ), moderate positive correlation between H3Cit and MPO ( $r = 0.4075$ ), and MPO and cfDNA ( $r = 0.4965$ ). Weak positive correlations were found between NE and cfDNA, H3Cit and EN, H3Cit and cfDNA. Furthermore, MPO and NE correlated with NLR ( $r = 0.2430$ ,  $r = 0.3029$ ) and Neutrophils ( $r = 0.3074$ ,  $r = 0.2858$ ). Thus, the highest levels of NETs markers in patients who died and the correlations found between them point to the contribution of this mechanism in the worsening of COVID-19 to an unfavorable outcome, and should be studied as a therapeutic strategy in individuals infected with the severe form of the disease, improving its prognosis.

**Keywords:** COVID-19. SARS-CoV-2. Neutrophil. Neutrophil Extracellular Traps.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição dos casos confirmados de COVID-19 no mundo (setembro, 2022) .....	23
Figura 2 – Picos de casos e óbitos confirmados de COVID-19 no Ceará segundo data de início de sintomas, de 2020 a 2022 .....	24
Figura 3 - Estrutura da Partícula do SARS-CoV-2. ....	25
Figura 4 - Estrutura do Genoma do SARS-CoV-2 .....	26
Figura 5 - Ciclo replicativo do SARS-CoV-2 .....	28
Figura 6 - Fibras de NETs envolvidas em bactérias vistas em microscopia eletrônica de varredura. A) <i>S. aureus</i> . B) <i>S. typhimurium</i> . C) <i>S. flexneri</i> .....	33
Figura 7 - Vias de ativação das NETs .....	35
Figura 8 - NETs e a imunotrombose na COVID-19 .....	40
Figura 9 - Neutrófilos na imunopatogênese da COVID-19: danos ao endotélio e epitélio pulmonar .....	42
Figura 10 - Fluxograma da seleção amostral .....	45
Figura 11 - Fluxograma do delineamento experimental .....	46
Figura 12 - Leitura da placa de 96 poços em espectrofotômetro .....	48
Figura 13 - Etapa de lavagem automatizada da placa de 96 poços .....	49
Figura 14 - Etapa de pipetagem da solução de parada nos 96 poços da placa .....	51
Figura 15 - Etapa de leitura dos tubos em Fluorímetro Qubit 2.0® para quantificação de cfDNA .....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características sociodemográficas e clínicas dos 78 pacientes com COVID-19 internados em UTI do IJF, Fortaleza/CE, em 2020/2021.....	55
Tabela 2 – Dados laboratoriais dos 78 pacientes com COVID-19 internados em UTI do IJF, Fortaleza/CE, em 2020/2021. Mediana (IQR) .....	57
Tabela 3 – Quantificação dos biomarcadores de NETs dos 78 pacientes com COVID-19 internados em UTI do IJF, Fortaleza/CE, em 2020/2021. Mediana (IQR).....	69

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição dos pacientes por sexo e desfecho clínico .....	54
Gráfico 2 - Distribuição dos pacientes por comorbidade e desfecho clínico .....	55
Gráfico 3 - Comparações entre desfechos clínicos com significância estatística (mediana com IQR) .....	56
Gráfico 4 - Comparações das dosagens de MPO, EN, H3Cit e cfDNA em plasma de pacientes com COVID-19 grave a partir do desfecho clínico (mediana com IQR).....	58
Gráfico 5 - Correlações entre marcadores de NETs dosados: MPO, EN, H3Cit e cfDNA .....	60
Gráfico 6 - Correlações entre os marcadores de NETs e dados laboratoriais.....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCDC	<i>Cambridge Crystallographic Data Centre</i>
cfDNA	<i>Cell Free DNA</i>
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>
ECA-2	<i>Enzima conversora de angiotensina 2</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ERGIC	<i>Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IRF	<i>Interferon regulatory fator</i>
MERS	<i>Middle East Respiratory Syndrome</i>
MERS-COV	<i>Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus</i>
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
PMA	<i>Phorbol myristate acetate</i>
PMN	<i>Polimorfonuclear</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
RBD	<i>Receptor Binding Domain</i>
RLR	<i>Rig-like receptor</i>
RT-qPCR	<i>Real time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SAPS 3	<i>Simplified Acute Physiology Score 3</i>
SARS	<i>Severe acute Respiratory Syndrome</i>
SARS-CoV	<i>Severe acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i>
SARS-CoV-2	<i>Severe acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
SRAG	<i>Síndrome Respiratória Aguda Grave</i>
SSRNA+	<i>Positive-sense single-stranded RNA</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMPRSS 2	<i>Transmembrane protease serine 2</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	21
<b>2.1</b>	<b>COVID-19</b> .....	21
<b>2.1.1</b>	<i>Coronavírus</i> .....	22
<b>2.1.2</b>	<i>Epidemiologia</i> .....	23
<b>2.1.3</b>	<i>Agente etiológico</i> .....	25
2.1.3.1	<i>Estrutura do SARS-CoV-2</i> .....	25
2.1.3.2	<i>Replicação do SARS-CoV-2</i> .....	27
<b>2.1.4</b>	<i>Características clínicas da COVID-19</i> .....	28
<b>2.1.5</b>	<i>Diagnóstico e características laboratoriais da COVID-19</i> .....	30
<b>2.1.6</b>	<i>Tratamento, vacinas e variantes</i> .....	31
<b>2.2</b>	<b>Resposta imunológica na COVID-19</b> .....	31
<b>2.2.1</b>	<i>Armadilhas extracelulares de neutrófilos</i> .....	33
2.2.1.1	<i>Mieloperoxidase</i> .....	36
2.2.1.2	<i>Elastase</i> .....	36
2.2.1.3	<i>Histona H3 Citrulinada</i> .....	37
2.2.1.4	<i>DNA livre de células</i> .....	38
<b>2.2.2</b>	<i>Papel das NETs na imunopatogênese da COVID-19 grave</i> .....	39
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES</b> .....	43
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	43
<b>4.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	43
<b>4.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	43
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	44
<b>5.1</b>	<b>População e descrição do estudo</b> .....	44
<b>5.2</b>	<b>Aspectos éticos</b> .....	44
<b>5.3</b>	<b>Critérios de inclusão e exclusão</b> .....	45
<b>5.4</b>	<b>Coleta e processamento das amostras</b> .....	45
<b>5.5</b>	<b>Delineamento experimental</b> .....	46

<b>5.6</b>	<b>Quantificação de marcadores de NETs por ELISA</b> .....	47
<b>5.6.1</b>	<i>Mieloperoxidase</i> .....	47
<b>5.6.2</b>	<i>Elastase</i> .....	48
<b>5.6.3</b>	<i>Histona H3 Citrulinada</i> .....	50
<b>5.7</b>	<b>Quantificação de marcador de NETs por fluorimetria</b> .....	51
<b>5.7.1</b>	<i>DNA livre de células</i> .....	51
<b>5.8</b>	<b>Análise estatística</b> .....	53
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	53
<b>6.1</b>	<b>Dados sociodemográficos, clínicos e laboratoriais</b> .....	53
<b>6.2</b>	<b>NETs</b> .....	57
<b>6.2.1</b>	<i>Análises de comparação</i> .....	57
<b>6.2.2</b>	<i>Análises de correlação</i> .....	59
<b>6.3</b>	<b>Resumo dos resultados</b> .....	62
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	62
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	66
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	67

## 1 INTRODUÇÃO

A doença do coronavírus 2019 (COVID-19) é caracterizada como um distúrbio respiratório agudo tendo em vista o forte comprometimento deste sistema. Entretanto, também deve ser considerado seu potencial multissistêmico, podendo atingir, além das vias respiratórias superiores e inferiores, outros sistemas como o renal, neurológico, cardiovascular e digestivo (FARA *et al.*, 2021).

A COVID-19 tem como agente etiológico o coronavírus causador da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), pertencente à família *Coronaviridae*. O SARS-CoV-2 foi identificado pela primeira vez em dezembro de 2019 na cidade de Wuhan, localizada na China, a partir de casos crescentes de pneumonia. Outros vírus da mesma família haviam desencadeado doenças respiratórias em humanos, sendo as outras duas mais importantes denominadas Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) e Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS). Acredita-se que o SARS-CoV-2 tenha passado pelo processo de transbordamento zoonótico e alcançado os seres humanos de forma patogênica, assim como ocorreu em SARS e MERS. Em março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a COVID-19 como pandemia, sendo assim, um desafio à saúde pública em todo o mundo (DHAMA *et al.*, 2020).

Caracterizada pelo seu amplo espectro clínico, a COVID-19 pode causar desde infecção assintomática e resfriados leves à SRAG, falência múltipla dos órgãos e óbito. Especialmente nos casos mais graves, além do dano direto causado pelo vírus a partir da infecção, o sistema imunológico dos pacientes infectados revela-se como importante componente na patogênese. Essa influência imunológica caracteriza-se pelo estímulo contínuo de células e moléculas, desregulação destes componentes e suas funções e mecanismos de escape viral, culminando em um exacerbado estado inflamatório o qual não é capaz de debelar o processo infeccioso (HADJADJ *et al.*, 2020; SCHRIJVER *et al.*, 2020).

Dentre os componentes do processo inflamatório encontram-se as células granulocíticas denominadas de neutrófilos. Um dos mecanismos dos neutrófilos para a proteção contra microrganismos é a liberação do seu conteúdo intracelular, principalmente o material genético envolto de histonas e proteínas granulares como elastase neutrofílica (EN) e mieloperoxidase (MPO) para o meio extracelular, conhecida por armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). Apesar da função a favor do hospedeiro, as NETs produzidas em excesso e com regulação prejudicada contribuem para o agravamento de doenças a partir de um estado

inflamatório excessivo que leva a danos sistêmicos no organismo, podendo evoluir para o óbito (ZUO *et al.*, 2020).

Dessa forma, tendo em vista a dimensão pandêmica da COVID-19, caracterizada pela elevada transmissibilidade, e o papel de marcadores inflamatórios no agravamento dos pacientes infectados, mostra-se relevante investigar os níveis de marcadores de NETs em indivíduos com COVID-19 grave visando ao entendimento das alterações na resposta imunológica pela infecção por SARS-CoV-2 e suas implicações no desfecho clínico, contribuindo na busca por alvos terapêuticos eficazes.

Assim, serão quantificados quatro marcadores de NETs em amostras de pacientes com COVID-19 grave do momento da admissão em unidade de terapia intensiva (UTI) e que após internação tiveram dois desfechos clínicos diferentes: alta hospitalar ou óbito.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 COVID-19

A COVID-19 é uma doença infecciosa de notificação compulsória imediata. Os primeiros casos surgiram no final de 2019 a partir de pacientes com febre, tosse seca e graves problemas respiratórios como pneumonia, de etiologia desconhecida. No dia 31 de dezembro do mesmo ano, a cidade de Wuhan havia notificado ao todo 27 casos e em 8 de janeiro de 2020, a partir do sequenciamento de amostras clínicas, foi anunciado pelo CCDC o isolamento do novo coronavírus. Em fevereiro de 2020, a OMS nomeou a doença como COVID-19 e o ICTV nomeou o vírus causador de SARS-CoV-2. Nesse mesmo mês, foi relatado o primeiro caso de COVID-19 no Brasil. A velocidade dos acontecimentos reflete o alcance global da doença em curto período de tempo, sendo classificada como pandemia em março de 2020 (DHAMA *et al.*, 2020). Segundo dados da OMS, até outubro de 2022 foram contabilizados aproximadamente 627 milhões de casos confirmados e 6 milhões de óbitos por COVID-19 no mundo.

A origem da doença permaneceu obscura enquanto as pesquisas para esse fim estavam em andamento. No entanto, atualmente, considera-se que tenha se disseminado a partir do mercado de frutos do mar de Huanan, em Wuhan, onde há a comercialização de animais silvestres. A partir de mutações e do contato com humanos, o vírus presente em morcegos se adaptou, e por meio de hospedeiros intermediários como pangolins, tornou-se capaz de infectar, causar a doença em seres humanos e ser transmitido entre estes. Esse processo de cruzamento de barreiras entre espécies recebe o nome de transbordamento zoonótico e foi possível de ser determinado pelo sequenciamento e comparação entre o material genético de coronavírus de morcegos e dos indivíduos infectados, a qual mostrou elevada semelhança genética (96%) (DHAMA *et al.*, 2020; PALACIOS CRUZ *et al.*, 2021).

É uma doença transmitida, principalmente, por meio do contato com aerossóis, gotículas respiratórias ou de saliva contendo as partículas virais liberadas a partir da fala, espirro ou tosse de indivíduos infectados, e eventualmente, por meio do contato com superfícies contaminadas e posterior manuseio do nariz ou boca (SCHRIJVER *et al.*, 2020). Apresenta período de incubação médio de 6 dias, podendo variar até 14 dias, sendo que para as novas variantes é descrita uma diminuição nesse tempo (3 dias para a Ômicron) (WU *et al.*, 2022). Quando sintomática, apesar de inicialmente atingir o trato respiratório causando sintomas gripais, sabe-se que a COVID-19 é caracterizada como uma doença multissistêmica

acompanhada de forte componente inflamatório, especialmente nos casos que evoluem com gravidade (CAVALCANTE-SILVA *et al.*, 2020; HAN *et al.*, 2020).

### 2.1.1 Coronavírus

Na década de 60, alguns vírus que causavam infecções respiratórias, gastroenterites e desordens neurológicas em galinha, porco e rato assim como viroses em humanos, foram agrupados como coronavírus por suas semelhanças, entre elas, o formato característico de coroa solar pela presença de espículas na superfície viral que deu o nome à família (MASTERS; PERLMAN, 2013). Em 1965, o primeiro coronavírus humano causador de resfriados, o HCoV-229E, foi descoberto por June Almeida e David Tyrrell a partir de amostras de secreções nasais de voluntários resfriados por meio do cultivo do vírus em anéis de traqueia humana (MAHASE, 2020). A partir de então, foram sendo identificados novos coronavírus principalmente visando à busca por reservatórios animais do vírus (MASTERS; PERLMAN, 2013).

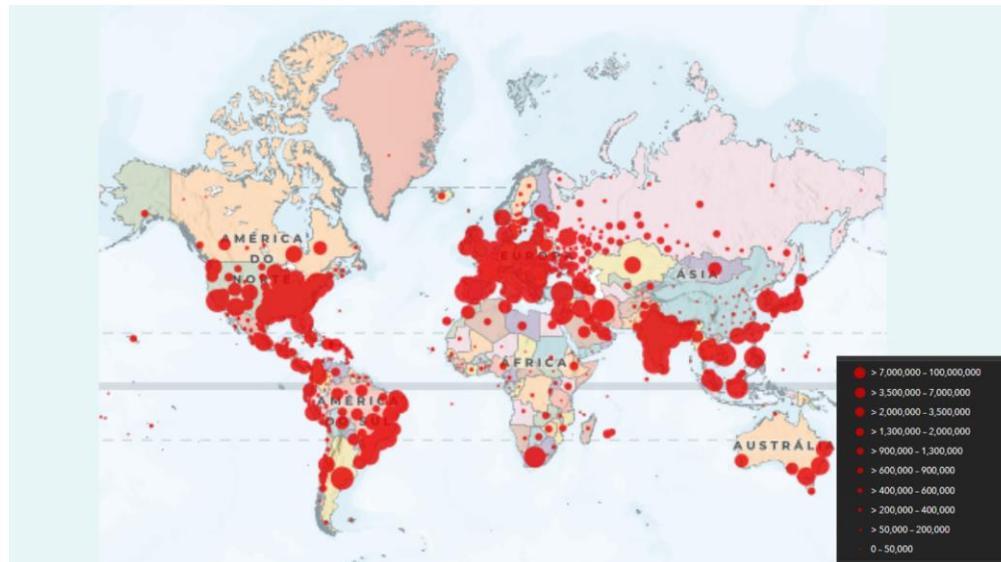
Dessa forma, os coronavírus são vírus de RNA envelopados pertencentes à ordem *Nidovirales*, à família *Coronaviridae*, e à subfamília *Orthocoronavirinae* a qual é formada pelos gêneros *Alfa*, *Beta*, *Gama* e *Deltacoronavirus* (SHAH *et al.*, 2020). Existem muitas espécies de coronavírus capazes de infectar mamíferos e outros animais, sendo sete conhecidas por causarem doenças em humanos. A maioria dessas (229E, NL63, OC43 e HKU1), são responsáveis por patologias mais brandas, levando a sintomas de resfriado comum. Entretanto, nas duas últimas décadas, três espécies (SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2) desencadearam doenças classificadas como Síndromes Respiratórias, com elevada mortalidade (CÂMARA; CÂMARA; MORENO, 2020).

Assim, as duas primeiras epidemias de coronavírus aconteceram no ano de 2002 pelo SARS-CoV e, posteriormente, em 2012, pelo MERS-CoV. Esses dois vírus pertencem ao gênero *Betacoronavirus* e apresentaram origem zoonótica (SHAH *et al.*, 2020). Caracterizadas por surtos locais, o SARS-CoV foi identificado na China, enquanto o MERS-COV surgiu na Jordânia e Arábia Saudita (AZKUR *et al.*, 2020). Por fim, na cidade chinesa Wuhan, em 2019, foi identificado o SARS-CoV-2, sendo classificado como um novo *Betacoronavirus* (ASTUTI; YSRAFIL, 2020). Quando comparado ao SARS e ao MERS-CoV, o novo coronavírus possui uma menor patogenicidade, entretanto, uma maior transmissibilidade, alcançando proporções pandêmicas (DHAMA *et al.*, 2020).

### 2.1.2 Epidemiologia

Segundo a OMS (2022), até outubro de 2022, foram confirmados aproximadamente 627 milhões de casos de COVID-19, nos quais estão incluídos os mais de 6 milhões de óbitos pela doença. O continente Americano ocupa o segundo lugar no número de casos e o primeiro lugar no número de óbitos com aproximada e respectivamente, 261 milhões e 2 milhões (Figura 1). O Brasil é o quinto país com maior número de casos confirmados, com mais de 34 milhões. Entretanto, com relação ao número de óbitos, o Brasil ocupa o segundo lugar com mais de 687 mil, sendo o primeiro ocupado pelos Estados Unidos (OMS, 2022). Segundo dados do Ministério da Saúde (2022) até outubro de 2022, a região Nordeste do Brasil possui a terceira maior na contagem acumulada de casos e a segunda na de óbitos por COVID-19 enquanto, dos estados do Nordeste, o Ceará ocupa o segundo lugar com mais de 1 milhão de casos e 27 mil óbitos, ficando atrás apenas da Bahia.

Figura 1 – Distribuição dos casos confirmados de COVID-19 no mundo (setembro, 2022)

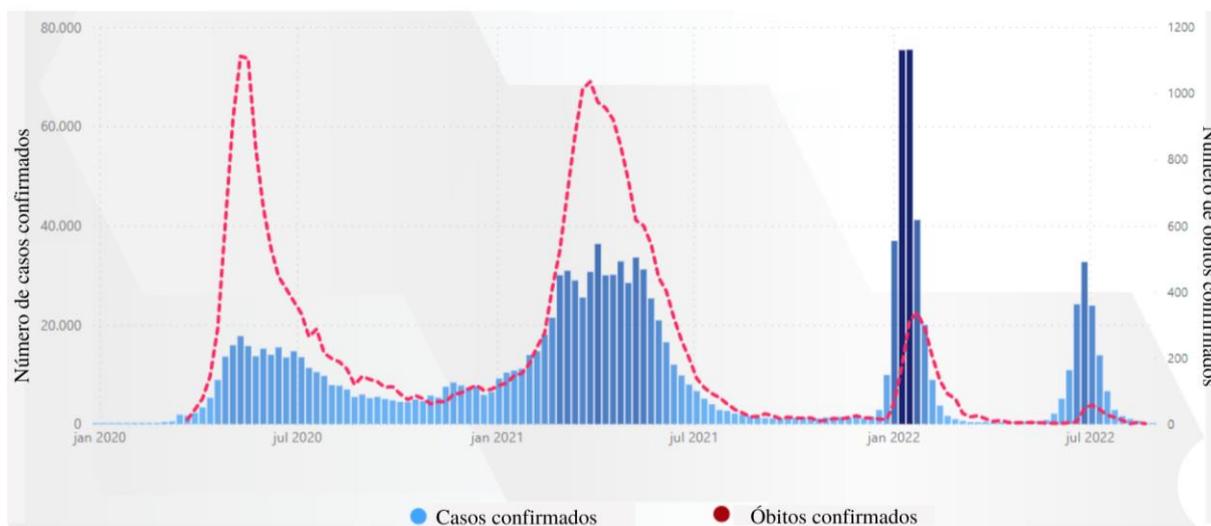


Fonte: Adaptado de Johns Hopkins (2022).

Na análise do gráfico apresentado na Figura 2, observam-se picos de casos e óbitos por COVID-19 no Ceará desde o início da pandemia. Em 2020, a elevação dos casos e óbitos é observada entre os meses de abril e julho, e em 2021, entre os meses de janeiro a maio. Em janeiro de 2022, apesar de apresentar o maior pico de casos, consequência do surgimento de novas variantes como a Ômicron, ocorreu uma diminuição da curva de óbitos por COVID-19,

a qual pode ser explicada pela importante administração dos imunizantes, reinfeções e baixa patogenicidade da variante Ômicron (DARIA; ISLAM, 2022).

Figura 2 – Picos de casos e óbitos confirmados de COVID-19 no Ceará segundo data de início de sintomas, de 2020 a 2022



Fonte: Adaptado de IntegraSUS (2022).

Considerando o período de março de 2020 a março de 2022 no Ceará, a faixa etária com maior mortalidade por COVID-19 foi a de 80 anos ou mais para ambos os sexos. A faixa etária com maior incidência de casos confirmados foi a de 80 anos ou mais para o sexo masculino e a de 35 a 39 anos para o sexo feminino. Com relação às comorbidades, diabetes mellitus (14,59%) e doença cardiovascular crônica (19,15%) foram as doenças mais presentes nos casos de COVID-19 no Ceará (CEARÁ, 2022).

Na décima semana epidemiológica de 2021 em Fortaleza/CE, indivíduos do sexo masculino (56%) foram mais acometidos pela doença, sendo este também o sexo de maior letalidade. Na faixa etária, 73% dos casos e 23% dos óbitos foram confirmados na população de 20-59 anos, enquanto 20% dos casos e 76% dos óbitos foram confirmadas no grupo com 60 anos ou mais, revelando aumento da gravidade da doença quanto maior a idade (FORTALEZA, 2021).

Como outros vírus, o SARS-CoV-2 evolui e adapta-se por meio de mutações adquiridas em seu processo de replicação originando as variantes. As variantes de preocupação são caracterizadas pela maior transmissibilidade e capacidade de escape ao sistema

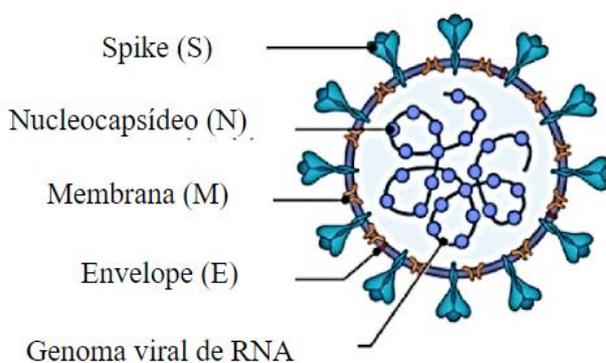
imunológico. Das variantes de preocupação, a Delta estava mais prevalente no estado do Ceará, em janeiro de 2022, com 594 casos identificados em 60 municípios, seguida pela Ômicron com 35 casos identificados em 6 municípios. Segundo boletim epidemiológico de maio de 2022, as variantes com maior circulação no estado passaram a ser a Ômicron (1.559 casos), seguida da Delta (1.377 casos) (CEARÁ, 2022).

### 2.1.3 Agente etiológico

#### 2.1.3.1 Estrutura do SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é um vírus de estrutura esférica, envelopado e de nucleocapsídeo helicoidal. O genoma é constituído por ácido ribonucléico fita simples, de polaridade positiva (ssRNA+), não segmentado e medindo aproximadamente 30 quilobases (kb). Com 100 a 160 nanômetros (nm) de diâmetro, a partícula viral é formada por 4 proteínas estruturais principais: glicoproteína spike (S), glicoproteína do envelope (E), glicoproteína da membrana (M), e proteína do nucleocapsídeo (N) (Figura 3) (ASTUTI; YSRAFIL, 2020; SHAH *et al.*, 2020).

Figura 3 – Estrutura da partícula do SARS-CoV-2



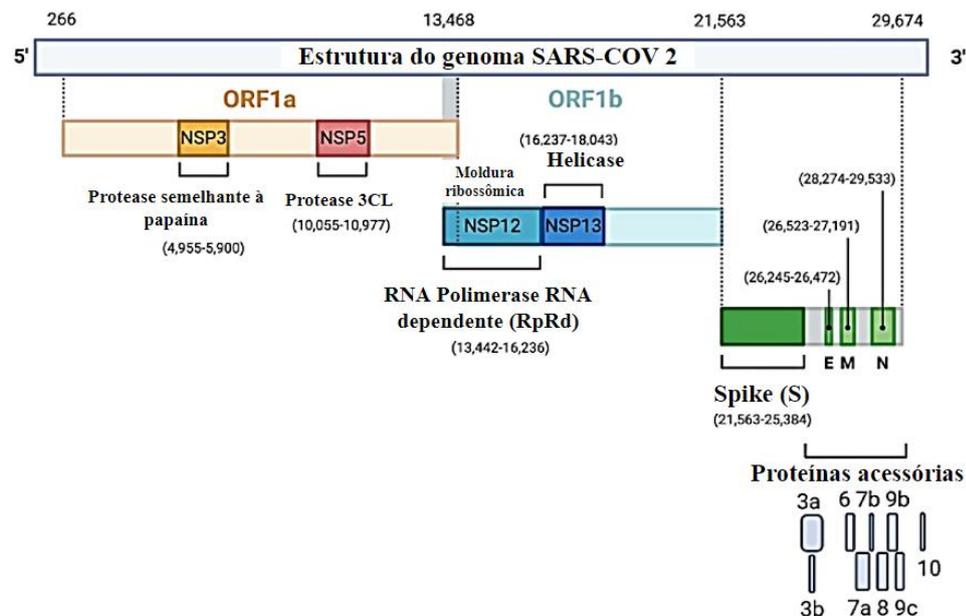
Fonte: Adaptado de Alanagreh; Alzoughool; Atoum (2020).

A glicoproteína S, além de conferir ao vírus o formato de coroa solar, é a responsável pelo reconhecimento do receptor celular do hospedeiro ECA-2, sendo a proteína mais imunogênica. Estruturalmente, é composta pela subunidade variável S1 que atua na ligação ao receptor e pela subunidade conservada S2 que age na fusão à membrana do hospedeiro. S1 é composta pelo domínio N-terminal (NTD) e pelo domínio C-terminal (CTD).

Este último possui a região de ligação ao receptor (RBD) a qual interage diretamente com ECA-2, possuindo aplicações no tratamento, prevenção e diagnóstico da COVID-19. Além disso, por ser importante alvo de mutações, RBD também contribui para o tropismo tecidual e para capacidade do vírus transpor barreiras interespecíes. A glicoproteína M é a mais abundante da partícula, dando forma ao envelope e participando do processo de montagem viral. A glicoproteína E atua como canal iônico (viroporina) participando da patogênese, montagem e liberação da partícula viral. Por fim, a glicoproteína N forma o nucleocapsídeo ao se associar com o RNA viral (DHAMA *et al.*, 2020).

O genoma do SARS-CoV-2 (Figura 4) é delimitado pelas regiões 5' UTR (cap) e 3' UTR (poli A) e contém pelo menos dez quadros de leitura aberta (ORFs). De 5' para 3', o genoma é dividido em genes que codificam as 16 proteínas não estruturais (nsp1-nsp16) que formam o complexo de replicação viral, estando representadas pela ORF1a e ORF1b. Após, encontram-se os genes que codificam as proteínas estruturais (S, E, M, N) e as proteínas acessórias (3a, 6, 7a, 7b, 8 e 10), localizados entre os genes estruturais (ASTUTI; YSRAFIL, 2020; CRUZ; LIMA; PEREIRA, 2021).

Figura 4 – Estrutura do Genoma do SARS-CoV-2



Fonte: Adaptado de Alanagreh; Alzoughool; Atoum (2020).

### 2.1.3.2 Replicação do SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2, quando não controlado pelas barreiras da resposta imunológica inata, atravessa o epitélio respiratório e por meio da circulação sanguínea e linfática, dissemina-se para outros órgãos que possuem receptores do vírus expressos em suas células. O principal receptor do SARS-CoV-2 é a enzima ECA-2, biologicamente envolvida na regulação da função cardíaca e pressão sanguínea. A ECA-2 encontra-se amplamente distribuída pelo organismo, sendo encontrada em maior quantidade nas células epiteliais dos pulmões, trato gastrointestinal, coração e rins (MASTERS; PERLMAN, 2013; FARA *et al.*, 2021).

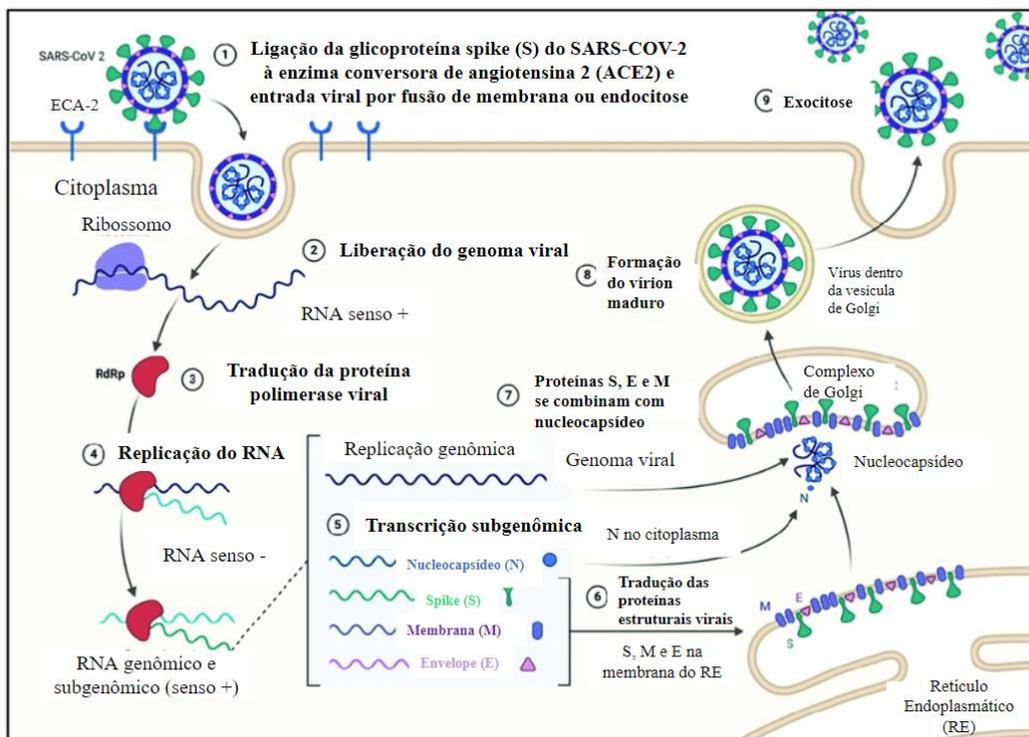
Além da ECA-2, outros receptores são capazes de permitir a penetração viral nas células hospedeiras. Entre eles está o CD147 presente em altas quantidades no cérebro, a neuropilina presente no epitélio olfativo e o CD26 em células linfematopoéticas, fígado, rim e músculo liso (MASRE *et al.*, 2020).

O ciclo replicativo (Figura 5) do SARS-CoV-2 inicia a partir da ligação da glicoproteína S do vírus à ECA-2 presente na superfície das células hospedeiras. Essa ligação é seguida pela clivagem proteolítica da glicoproteína S por proteases como furina e serino protease transmembranar (TMPRSS2) expressas na célula e mudança conformacional da glicoproteína, permitindo a exposição da região RBD de S1 e sua interação com a ECA-2. Em seguida, ocorre o processo de fusão do vírus à membrana celular. O vírus também pode penetrar na célula pela via endocítica com a formação de endossomo, no qual a acidificação do meio e ação das proteases lisossomais como a catepsina promovem o desnudamento culminando na liberação do material genético viral na célula (ASTUTI; YSRAFIL, 2020; FARA *et al.*, 2021).

Após a fusão membranar ou endocitose, o genoma viral é liberado no citoplasma. Como o RNA do SARS-CoV-2 é de polaridade positiva (sentido 5'-3'), este atua como RNA mensageiro fazendo com que ORF1a e ORF1b sejam traduzidos diretamente. Assim, são produzidas as poliproteínas pp1a e pp1ab que serão processadas para formação das proteínas não estruturais. Após clivagem proteolítica por proteases virais, origina-se o complexo de replicação e transcrição, organizado em vesículas de membrana dupla no retículo endoplasmático e composto pelas nsp1 a nsp16, estando entre elas a RNA polimerase dependente de RNA (Rprd). Esse complexo atua no material genético viral permitindo a transcrição descontínua com produção de RNA subgenômicos. Estes, por sua vez, são traduzidos pelos ribossomos do hospedeiro, produzindo as proteínas estruturais do vírus (DHAMA *et al.*, 2020; CRUZ; LIMA; PEREIRA, 2021; FARA *et al.*, 2021).

Concomitantemente, a partir do RNA genômico, ocorre a replicação com a produção de novas cópias do material genético, sendo produzidos RNA de polaridade negativa que servem de molde para a confecção de ssRNA+. Após processamento das proteínas estruturais no ERGIC e montagem da partícula viral, esta é liberada por exocitose sendo capaz de infectar outras células e tecidos (CRUZ; LIMA; PEREIRA, 2021).

Figura 5 – Ciclo replicativo do SARS-CoV-2



Fonte: Adaptado de Alanagreh; Alzoughool; Atoum (2020).

### 2.1.4 Características clínicas da COVID-19

As manifestações clínicas da COVID-19 variam amplamente, sendo observados, em sua maioria (80%), pacientes assintomáticos ou com sintomas leves e moderados similares à gripe. Em uma menor parcela (20%), ocorrem casos graves que podem chegar à pneumonia severa e evoluir à morte (LI *et al.*, 2020; SCHRIJVER *et al.*, 2020). Aproximadamente 20% dos pacientes com COVID-19 precisam ser admitidos em hospitais e 5% são internados em UTI (YANG *et al.*, 2020). Nesse último grupo, a mortalidade atinge valores de 40 a 50% (FARA *et al.*, 2021).

Dessa forma, os pacientes sintomáticos são agrupados em 4 classificações da doença: leve, moderada, grave e crítica. Os sintomas apresentados pelos pacientes leves e moderados incluem febre (98%), dores no corpo ou fadiga (44%), tosse (76%), diarreia (3%), cefaleia (8%), odinofagia, anosmia e ageusia (DHAMA *et al.*, 2020). Os casos leves apesar de manifestarem sintomas, não apresentam dispneia e os exames de imagem do tórax são normais. Na forma moderada os pacientes apresentam desconforto respiratório, exames de imagem alterados e saturação de oxigênio (SpO<sub>2</sub>) maior ou igual a 94% (NIH, 2021).

Os pacientes graves apresentam mais parâmetros respiratórios alterados: taxas de respiração  $\geq 30$  por minuto, SpO<sub>2</sub> <94%, razão entre a pressão parcial de oxigênio arterial e a fração inspirada de oxigênio (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>) menor que 300 mmHg ou infiltrados pulmonares maiores que 50%. A forma crítica caracteriza-se por falência respiratória, sendo necessário o uso de equipamentos de ventilação mecânica, além de choque séptico e falência dos órgãos (NIH, 2021).

Esse amplo espectro de perfis clínicos está principalmente associado a fatores como resposta imunológica, idade e presença de comorbidades (LI *et al.*, 2020; SCHRIJVER *et al.*, 2020). Os pacientes que evoluem para a COVID-19 grave são, em sua maioria, aqueles que possuem fatores de risco como idade avançada (>60 anos), hipertensão, diabetes, obesidade e imunossupressão (SCHRIJVER *et al.*, 2020). Além desses fatores, tem-se observado um maior número de casos em pessoas do sexo masculino. Supõe-se que as causas estejam associadas a comportamentos de risco ou por questões hormonais em que a ação anti-inflamatória da testosterona leva a respostas atenuadas contra patógenos em homens, enquanto níveis mais altos de estrogênios estão relacionados a reações imunológicas mais resolutivas (DHAMA *et al.*, 2020; FRAGA-SILVA *et al.*, 2021).

Com relação ao sistema imunológico, percebe-se a importância do seu equilíbrio e regulação, uma vez que os pacientes graves também estão associados a uma resposta imune exacerbada e desregulada ao vírus, com elevação dos componentes inflamatórios. A doença grave ocasiona complicações em nível de sistema respiratório como pneumonia e síndrome respiratória aguda grave (20-41% dos casos graves), mas também afeta outros órgãos, culminando em coagulopatias, comprometimento renal, cardíaco, neurológico, e disfunção múltipla dos órgãos (SCHRIJVER *et al.*, 2020). Estes distintos comprometimentos possuem a inflamação exacerbada como uma das causas em comum (FARA *et al.*, 2021).

### **2.1.5 Diagnóstico e características laboratoriais da COVID-19**

O diagnóstico da COVID-19 é uma importante ferramenta para adoção de medidas de segurança como o isolamento nos casos confirmados, e também, para a vigilância epidemiológica. Pode ser realizado por métodos diretos, representados pelas técnicas moleculares, ou por métodos indiretos, representados pelas técnicas sorológicas (BRASIL, 2021).

As técnicas moleculares utilizadas são agrupadas nos testes de amplificação de ácido nucléico (NAAT). Dentre eles, o padrão ouro para o diagnóstico da COVID-19 é o método molecular de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) o qual detecta o RNA do vírus e determina a carga viral a partir de amostras de trato respiratório como secreção de nasofaringe. Os ensaios moleculares possuem como alvo os genes que codificam N, E e S, regiões da ORF1a e ORF1b e o gene da RdRp do vírus. Esses testes possuem alta sensibilidade e especificidade, permitindo diagnosticar a doença em indivíduos com infecção ativa do 3º ao 8º dia do início dos sintomas (LAI; LAM, 2021; BRASIL, 2021).

Os testes sorológicos detectam os anticorpos produzidos em resposta ao vírus ou antígenos da estrutura viral. O antígeno mais utilizado como alvo diagnóstico é a proteína N, sendo pesquisado em amostras de secreção de nasofaringe por meio de teste imunocromatográfico (teste rápido) ou imunoenzimático (ELISA sanduíche). Os testes para detecção de antígeno devem ser utilizados para o diagnóstico na fase aguda da doença, do 1º ao 7º dia do início dos sintomas. Os anticorpos das classes IgM, IgG e IgA contra as proteínas N e S, inicialmente aplicados no diagnóstico, não são mais utilizados para este fim devido à vacinação em massa (BRASIL, 2021; YUCE; FILIZTEKIN; OZKAYA, 2021; RAI *et al.*, 2021).

Além dos testes para o diagnóstico, os exames laboratoriais de pacientes com COVID-19 revelam alterações importantes as quais podem auxiliar na predição do agravamento da doença. Dentre os achados mais relevantes descritos estão marcadores inflamatórios elevados como proteína C reativa (PCR), ferritina e dímero D. Outras alterações importantes são linfopenia, neutrofilia, elevada razão neutrófilo e linfócito (NLR), elevação de aminotransferases, LDH (lactato desidrogenase) e tempo de protrombina. Esses achados encontram-se mais alterados nos casos graves e revelam o quadro inflamatório do indivíduo infectado (DHAMA *et al.*, 2020; HADJADJ *et al.*, 2020).

### **2.1.6 Tratamento, vacinas e variantes**

O tratamento de indivíduos infectados com SARS-CoV-2 baseia-se principalmente em medicamentos e estratégias de suporte aos sintomas, de acordo com cada caso. Em pacientes mais graves pode ser necessária a administração de anticoagulantes, corticoides e antibióticos. Além disso, muitas pesquisas promissoras com antivirais e anticorpos monoclonais estão em andamento, com alvo no ciclo replicativo do vírus, mas também contra componentes inflamatórios exacerbados na COVID-19. Alguns desses fármacos como o antiviral remdesivir e o anticorpo monoclonal tocilizumabe foram autorizados e são utilizados no Brasil para tratamento da COVID-19 (BRASIL, 2021; CRUZ; LIMA; PEREIRA, 2021). Os antivirais nirmatrelvir e ritonavir foram incluídos, em maio de 2022, no Sistema Único de Saúde para casos leves a moderados da doença (BRASIL, 2022).

As vacinas contra COVID-19 são essenciais para a prevenção dos casos graves da doença, diminuindo a mortalidade desta. Segundo a OMS, em janeiro de 2022 o número de doses aplicadas no mundo chegou a mais de 9 bilhões. Os imunizantes administrados baseiam-se em diferentes plataformas, sendo a vacina de vírus inativado CoronaVac (Instituto Butantan e Sinovac), a primeira a ser utilizada no Brasil. Três outras foram autorizadas pela ANVISA, sendo elas: a vacina da AstraZeneca em parceria com a Universidade de Oxford que utiliza vetor viral de adenovírus de chimpanzé, a vacina da Pfizer em parceria com o laboratório BioNTech e Fosun Pharma a qual utiliza a metodologia do RNA mensageiro e a vacina da Janssen da Johnson & Johnson que se baseia no vetor viral de adenovírus humanos (BRASIL, 2021; SHAH; WOO *et al.*, 2021).

Um dos desafios da eficácia da vacina é o surgimento de variantes. Por ser um vírus de RNA e pela sua polimerase não possuir mecanismos de reparo de erros, o SARS-CoV-2 está mais sujeito a mutações e recombinações durante sua replicação. Essas alterações no material genético podem ser selecionadas positivamente, culminando em eventos como o transbordamento zoonótico e o surgimento de novas variantes do vírus. Dentre as variantes de preocupação estão as denominadas Alfa, Beta, Gama, Delta e Ômicron (MISTRY *et al.*, 2022).

## **2.2 Resposta Imunológica na COVID-19**

O sistema imunológico atua na defesa aos vírus a partir de mecanismos das imunidades inata e adaptativa, os quais visam à eliminação de células infectadas e ao

impedimento da infecção. As formas leves e moderadas da COVID-19 estão associadas a respostas resolutivas, as quais possuem início e fim em período de tempo adequado (HAN *et al.*, 2020).

Entretanto, segundo Abbas, Lichtman e Pillai (2019) “a falha do sistema imune em controlar as infecções broncopulmonares e as respostas imunes ou inflamatórias excessivas às infecções constituem as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo inteiro”. Dessa forma, indivíduos que evoluem para a forma grave da COVID-19 são caracterizados por uma resposta não resolutiva em que a infecção viral afeta o funcionamento e a regulação da resposta imunológica inata e adaptativa, podendo ser vistas alterações celulares e moleculares dos componentes desse sistema. Essas alterações, entre elas, a inflamação exacerbada, revelam como os danos desencadeados pela desregulação da resposta imunológica podem ser maiores que os danos por mecanismos patogênicos virais (BOUADMA *et al.*, 2020; ACKERMANN *et al.*, 2021).

A imunidade inata é composta por barreiras, moléculas e células responsáveis por uma resposta rápida ao microrganismo invasor, atuando como primeira linha de defesa. O epitélio do trato respiratório, sítio primário da COVID-19, é composto por barreiras físicas como os cílios e por barreiras químicas como muco, defensinas e catelicidinas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019). Quando o vírus resiste a essas barreiras e inicia seu ciclo replicativo em células do epitélio mucoso e, posteriormente, em macrófagos e células dendríticas, ocorre o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como o RNA e proteínas virais, por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Esses receptores estão presentes na membrana plasmática e endossômica (TLR) e também no citoplasma (RLR) da célula hospedeira infectada (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

A partir desse reconhecimento, ocorre a ativação de vias de sinalização e de fatores de transcrição (IRF, NF-KB) os quais, atuando no genoma do hospedeiro, permitem a síntese de interferon do tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) e III responsáveis pela indução de um estado antiviral. Além disso, citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), quimiocinas (CCL2, CXCL8) e moléculas de adesão ao endotélio também são expressas, as quais atuam no processo inflamatório. Dessa forma, o sistema imune inato atua na infecção e em lesões teciduais por meio da inflamação e da resposta antiviral. Na inflamação ocorre o recrutamento de leucócitos, como os neutrófilos, e alterações vasculares que possibilitam os processos efetores celulares (CAVALCANTE-SILVA *et al.*, 2020; HADJADJ *et al.*, 2020; FARA *et al.*, 2021). Os mecanismos antivirais garantidos pelos IFNs, como apoptose de células infectadas, inibição da

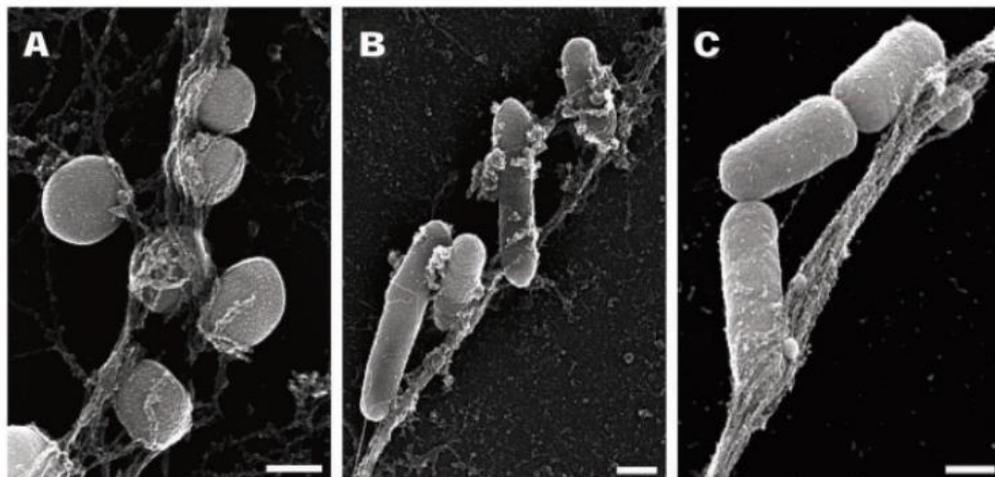
disseminação do vírus para células vizinhas não infectadas, degradação de RNA, diminuição da síntese protéica e indução da resposta adaptativa, são essenciais na contenção da infecção viral, e quando estes não são eficazes, há persistência viral e processo inflamatório exacerbado (STEGELMEIER *et al.*, 2021).

### 2.2.1 Armadilhas extracelulares de neutrófilos

Os neutrófilos, leucócitos mais abundantes na circulação sanguínea (50-70%), são células que compõem a classificação dos granulócitos por possuírem grânulos citoplasmáticos primários (azurófilos) e secundários (específicos) os quais contêm enzimas e proteínas atuantes em suas funções. Sendo as primeiras células a migrarem ao local da infecção no processo inflamatório, os neutrófilos desempenham ações de defesa contra patógenos. Para essa função, os neutrófilos são capazes de reconhecer os PAMPs e DAMPs e ativar a resposta imunológica a partir de mecanismos como fagocitose, degranulação e formação de espécies reativas de oxigênio. Além disso, essas células também são capazes de participar da inflamação por meio da biossíntese de citocinas inflamatórias e imunorreguladoras e fatores para a homeostase sanguínea (SABBATINI; MAGNELLI; RENO, 2021).

Outro mecanismo dos neutrófilos na defesa contra patógenos foi descoberto em 2004 por Brinkmann e colaboradores por meio de estudos com bactérias (Figura 6) (BRINKMANN *et al.*, 2004; VOROBEVA, 2020). Esse estudo mostrou que, por meio de modificações citoplasmáticas e nucleares, os neutrófilos ativados liberam o seu conteúdo intracelular ao meio extracelular, sendo chamado de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (THIERRY; ROCH, 2020).

Figura 6 – Fibras de NETs envolvidas em bactérias vistas em microscopia eletrônica de varredura. A) *S. aureus*. B) *S. typhimurium*. C) *S. flexneri*



Fonte: Brinkmann *et al.* (2004).

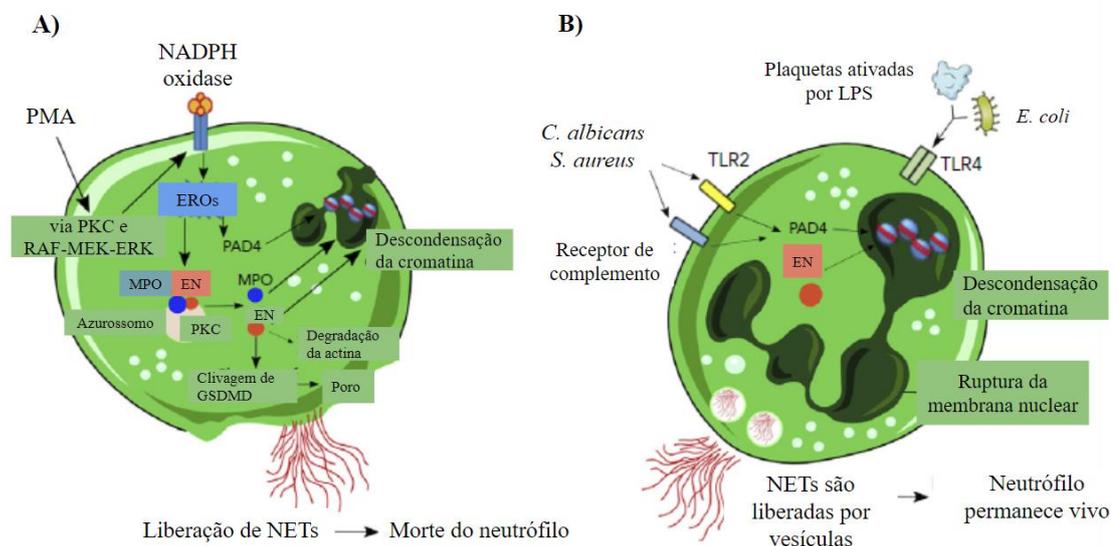
As NETs são compostas de DNA associado a histonas, enzimas oxidativas, como EN e MPO, e proteínas microbidas, que atuam na contenção do microrganismo e conseqüentemente da infecção. A sobrevivência ou não dos neutrófilos e a origem do DNA liberado classifica esse processo em três tipos: a formação de NETs lítica, não lítica e mitocondrial (CASTANHEIRA; KUBES, 2019; TAN; AZIZ; WANG, 2020). Além do estímulo pelos componentes estruturais dos microrganismos como bactérias, fungos e vírus, as NETs também podem ser induzidas por anticorpos, plaquetas, citocinas e outras moléculas como colesterol e substâncias farmacológicas como o PMA. No caso da COVID-19, acredita-se que as NETs podem ser estimuladas no contexto de células epiteliais danificadas pelo vírus, plaquetas e células endoteliais ativadas, citocinas pró-inflamatórias (IL-8, GM-CSF) e complexos imunes (ZUO *et al.*, 2020). Os distintos tipos de NETs são acionados a depender do estímulo inicial e das diferentes vias de sinalização ativadas por ele (Figura 7) (VOROBEVA, 2020).

A formação de NETs lítica culmina com a morte do neutrófilo por meio de via dependente da enzima NADPH oxidase (NOX), sendo descrita uma menor capacidade de formação de NETs em pacientes com deficiência hereditária de NOX na doença granulomatosa crônica (RAVINDRAN; KHAN; PALANIYAR, 2019). A partir da fosforilação das subunidades da NOX por cinases, ocorre a montagem e ativação da NOX nas membranas dos grânulos específicos e citoplasmática, sendo formadas espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs estimulam a liberação da EN de um complexo associado à membrana granular (azurossomo) para o citosol e ativa sua atividade proteolítica de forma MPO-dependente (METZLER *et al.*, 2014). Dessa forma, as proteínas granulares são liberadas no citosol, onde a EN cliva filamentos de actina levando à dissociação do citoesqueleto e imobilização do neutrófilo. As proteínas granulares alcançam o núcleo, onde atuam em modificações estruturais das histonas e conseqüente descondensação da cromatina. As ações da EN e MPO são constituintes fundamentais na formação das armadilhas; de forma que camundongos e indivíduos deficientes nestas enzimas não podem produzir NETs (VOROBEVA, 2020; SABBATINI; MAGNELLI; RENO, 2021). O processo de descondensação da cromatina também recebe contribuição da peptidilarginina deaminase 4 (PAD4), que atua na citrulinização das histonas (descrita no tópico 2.2.1.3). A PAD4 é uma enzima citoplasmática com ativação dependente de cálcio e EROs, moléculas produzidas na sinalização de NETs. Quando ativada,

a PAD4 migra para o núcleo atuando também no aumento da permeabilidade nuclear. Por fim, após a descondensação e associação das proteínas dos grânulos com a cromatina, a rede de NETs é liberada no espaço extracelular por poros formados na membrana nuclear e citoplasmática por meio da proteína gasdermina D (GSDMD), ativada por EN (TAN; AZIZ; WANG, 2020). É descrito que o SARS-CoV-2 é capaz de ativar diretamente a GSDMD, desencadeando a produção de NETs (SILVA *et al.*, 2022).

A formação de NETs não lítica é um processo independente de NOX e não resulta na morte do neutrófilo. Nesta via, a EN também é translocada para o núcleo e ocorre a participação da PAD4, entretanto, a rede de NETs é expelida por vesículas, sem ruptura da membrana plasmática, permitindo a manutenção de funções como a fagocitose (CASTANHEIRA; KUBES, 2019). Na formação de NETs mitocondrial, o DNA é originado da mitocôndria da célula, não resulta na morte do neutrófilo e ocorre com a produção de EROs (TAN; AZIZ; WANG, 2020).

Figura 7 – Vias de ativação das NETs. A) Formação de NETs lítica. B) Formação de NETs não lítica



Fonte: Adaptado de Castanheira; Kubes (2019).

As NETs são caracterizadas por efeitos anti e pró-inflamatórios. No componente anti-inflamatório, modulam a inflamação pela ligação e sequestro de citocinas que são então

degradadas pelas serino proteases da sua rede (SABBATINI; MAGNELLI; RENO, 2021). Entretanto, também contribuem para a inflamação uma vez que podem induzir a liberação de citocinas, IFN-I e ativação do inflamassoma NLRP3, além de ativarem o sistema complemento (ACKERMANN *et al.*, 2021).

Achados da COVID-19 grave como neutrofilia, elevada NLR, elevações de GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6 e dímero D, assim como os aspectos da patogênese se encaixam no contexto de formação de NETs (ZUO *et al.*, 2020).

### 2.2.1.1 Mieloperoxidase

A MPO é uma metaloproteína dimérica com peso molecular de 140 kilodaltons (kD) constituinte dos grânulos azurófilos dos neutrófilos. Além dessa localização, também pode ser encontrada em quantidade consideravelmente menor (cerca de 1/3 da presente em neutrófilos) nos lisossomos dos monócitos. Sua função principal envolve a ação enzimática contra microrganismos em fagossomos, por catalisar a produção de ácidos (hipocloroso, hipobromoso, hipiodoso) e superóxidos a partir de peróxido de hidrogênio e íons de haleto (Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>). Dessa forma, os produtos enzimáticos da MPO são altamente reativos e levam à oxidação de proteínas, lipídeos e outras moléculas (ARATANI, 2018; KARGAPOLOVA *et al.*, 2021).

Além da atividade enzimática, a MPO também atua na produção e constituição das NETs, estando principalmente associada ao DNA. Na formação das NETs, a carga positiva dessa proteína permite a ligação da MPO com o DNA livre carregado negativamente. Além disso, a partir dessa propriedade de carga catiônica, a MPO pode alterar mecanismos celulares que levam à autofagia e pode se ligar ao glicocálice das células endoteliais causando disfunção dessas células. Níveis desregulados de MPO são relatados em condições de dano tecidual e inflamação como distúrbios neurológicos degenerativos como Alzheimer e Parkinson, além de carcinogênese, doenças cardiovasculares e autoimunes (ARATANI, 2018; KARGAPOLOVA *et al.*, 2021).

### 2.2.1.2 Elastase

A EN é uma das serino proteases presentes nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, sendo a mais abundante (aproximadamente 67.000 moléculas por grânulo) e possuindo peso molecular de 29,5 kD. Além da sua localização nos grânulos, a EN também pode ser encontrada

ligada a proteoglicanos de sulfato de condroitina e de heparam sulfato na superfície dos neutrófilos ativados. A EN pode reagir com diversos substratos, intra ou extracelularmente, incluindo proteínas microbianas, proteínas da matriz extracelular, fatores de coagulação e citocinas inflamatórias, contribuindo para a defesa inata contra microrganismos e danos. Dos mecanismos inatos, a EN participa do processo de fagocitose, juntamente com a MPO, NADPH oxidase e peptídeos antimicrobianos. Como a MPO, também é componente das NETs e atua em sua produção a partir da descondensação da cromatina (KORKMAZ *et al.*, 2010; RYDZYNSKA *et al.*, 2021; VOYNOW; SHINBASHI, 2021).

A atividade de EN é regulada por inibidores (exemplo,  $\alpha$ 1-antitripsina) uma vez que é descrita sua contribuição, quando em elevadas quantidades, na patogênese de doenças inflamatórias envolvendo pulmões, rins, sistema cardiovascular e tumores. Em doenças pulmonares crônicas, a EN diminui a motilidade ciliar e aumenta a produção de mucina, bloqueando a depuração mucociliar e causando obstrução das vias aéreas. Outro efeito deletério da EN é a sua capacidade de degradar proteínas da matriz extracelular, moléculas da imunidade inata (lactoferrina, opsoninas como as proteínas surfactantes SP-D e SP-A e proteínas do sistema complemento e receptores fagocíticos) e ativar sinalização de vias pró-inflamatórias, ocasionando lesão celular e tecidual além de persistência da infecção (VOYNOW; SHINBASHI, 2021).

### 2.2.1.3 Histona H3 Citrulinada

As histonas, incluindo a de tipo H3, são proteínas (11 kD a 21 kD) que se ligam ao DNA formando a cromatina, a qual confere a compactação dessa molécula no núcleo. A ligação ao DNA é devida à elevada quantidade de cargas positivas das histonas pela presença dos aminoácidos arginina e lisina. No processo de formação das NETs, a enzima PAD4 é translocada do citoplasma ao núcleo e promove a desaminação da arginina em citrulina (nos resíduos R2, R8 e R17 da H3), levando à descondensação da cromatina. Dessa forma, o DNA é liberado nas NETs associado também a histonas do tipo 3 citrulinadas (H3Cit) (MASUDA *et al.*, 2016; SORENSEN; BORREGAARD, 2016).

É descrito que as histonas citrulinadas correspondem à maior parte das proteínas que compõem as NETs e que a inibição de PAD4 *in vitro* e *in vivo* impede a sua formação. Dessa forma, além da H3Cit, outras histonas (H1, H2A, H2B, H4) foram identificadas como componentes de NETs, entretanto, a H3Cit é considerada como um biomarcador específico em

seu estudo (TAN; AZIZ; WANG, 2020). Com relação à defesa contra microrganismos, sua elevada composição catiônica contribui para a capacidade de ligação às membranas celulares, desencadeando resposta citotóxica e inflamatória. Além disso, o papel indireto das histonas citrulinadas é permitir a interação do DNA com os patógenos e sua consequente capacidade microbicida (MASUDA *et al.*, 2016; SORENSEN; BORREGAARD, 2016).

As histonas modificadas podem atuar como antígenos e ocasionar a formação de autoanticorpos envolvidos com doenças autoimunes, trombose e vasculites (SOSENSEN; BORREGAARD, 2016). Além disso, um aumento nos níveis séricos de H3Cit relaciona-se com o mau prognóstico em condições de inflamação exacerbada como na sepse (DRAGONI; HERTOUGH; VERMEIRE, 2021).

#### 2.2.1.4 DNA livre de células

Segundo Brinkmann *et al.* (2004), o DNA livre de células (cfDNA) é o principal constituinte das NETs, sendo sua estrutura desintegrada pelo tratamento com DNAses. Esse componente é caracterizado como o DNA de origem intracelular localizado fora da célula por mecanismos de liberação ativos ou passivos, ou por lise celular (PIETRAMELLARA *et al.*, 2009; NAGLER *et al.*, 2018; MONTICOLO *et al.*, 2020). No caso das NETs, o cfDNA pode ser originado tanto do núcleo como da mitocôndria. O cfDNA contribui fisicamente para a atividade antimicrobiana das NETs pela imobilização do agente infeccioso e também em virtude da sua composição química, a partir do sequestro de cátions, rompimento da integridade da membrana e lise das células de microrganismos (MONTICOLO *et al.*, 2020).

O cfDNA pode ser reconhecido como DAMP e desencadear uma resposta imunológica nociva (MONTICOLO *et al.*, 2020). A partir de 1948, o cfDNA passou a ser descoberto no plasma e soro de pacientes com acometimentos crônicos das vias aéreas como fibrose cística, doenças autoimunes e neurodegenerativas, câncer e hipertensão. O complexo cfDNA-histona é relatado pelo seu papel no desenvolvimento de autoanticorpos, no estímulo de citocinas pró-inflamatórias e citotoxicidade, podendo ser desencadeador da inflamação exacerbada presente na patogênese das doenças relacionadas (ZAWROTNIAK; RAPALAKOZIK, 2013; MONTICOLO *et al.*, 2020).

### 2.2.2 Papel das NETs na imunopatogênese da COVID-19 grave

Na COVID-19 a resposta imunológica do hospedeiro tem importante papel em levar a doença a um desfecho favorável ou a um quadro de complicações (HADJADJ *et al.*, 2020). Uma exacerbada e prolongada resposta imune inata leva à desregulação do sistema imunológico adaptativo. Nisso estão relacionadas a dificuldade na depuração viral e a inflamação excessiva, fatores que pioram o prognóstico do paciente (SCHRIJVER *et al.*, 2020).

O que se observa em pacientes com COVID-19 é a capacidade do vírus de evadir-se do sistema imunológico, por diversos mecanismos. Entre eles está o bloqueio da expressão e sinalização dos IFNs tipo I e III pelas proteínas virais. Sendo estes IFNs atuantes na defesa antiviral, é descrito que pacientes em estados críticos possuem uma menor resposta de IFNs tipo I e III em comparação com aqueles com COVID-19 leve e moderada (HADJADJ *et al.*, 2020). Além disso, as células dendríticas plasmocitóides, produtoras significativas destes IFNs, foram encontradas em baixa frequência na circulação de pacientes hospitalizados com COVID-19 grave (HADJADJ *et al.*, 2020; PALUDAN; MOGENSEN, 2022). O escape viral leva à persistência do microrganismo, compondo, assim, um cenário de células infectadas e constantemente estimuladas que elevam a produção de citocinas pró-inflamatórias e o recrutamento exacerbado de células imunes como os neutrófilos, caracterizando a neutrofilia acentuada desses pacientes (CAVALCANTE-SILVA *et al.*, 2020; CHUA *et al.*, 2020). Abundantes agregados de neutrófilos também foram encontrados no tecido pulmonar em estudos *post-mortem*, sem que houvesse uma marcante presença viral o que mostra que pacientes que foram a óbito possuíam os órgãos afetados principalmente por uma resposta inflamatória (SCHURINK *et al.*, 2020).

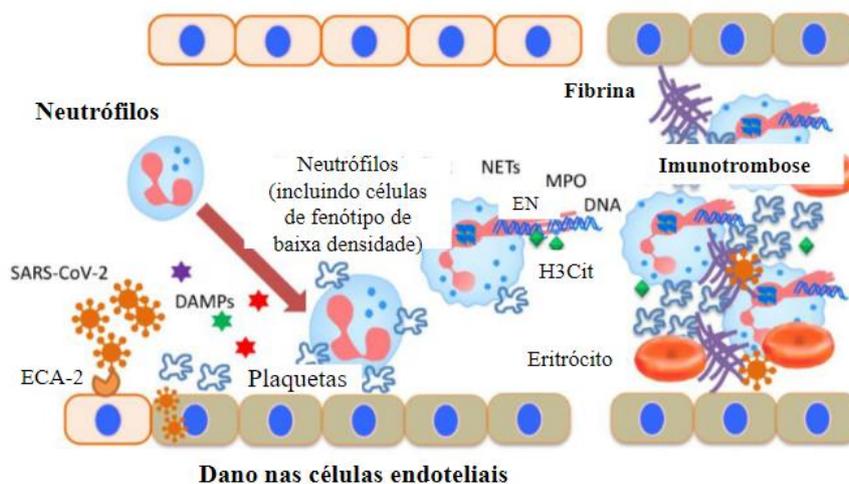
A NLR é considerada um marcador de mau prognóstico para a COVID-19. A elevação da NLR encontrada nos pacientes graves deve-se ao aumento dos neutrófilos circulantes e, em contrapartida, a uma diminuição dos linfócitos funcionais por mecanismos de apoptose e exaustão que podem ser explicados pelo estado de hiperativação dessas células por meio de moléculas como citocinas pró-inflamatórias liberadas em excesso (HADJADJ *et al.*, 2020; PALUDAN; MOGENSEN, 2022; MORTEZAEI; MAJIDPOOR, 2022).

Tendo em vistas essas alterações relacionadas aos neutrófilos, é descrita a associação entre essas células e NETs com a patogênese dos casos graves de COVID-19 no que se refere a inflamação, dano tecidual, imunotrombose e coagulopatias responsáveis por danos

a órgãos como coração, pulmão e rins (ZUO *et al.*, 2020; ACKERMANN *et al.*, 2021). As NETs podem atuar positiva ou negativamente dependendo da sua quantidade, qualidade e duração. Em situação regulada, os componentes das NETs, após cumprirem sua função, são removidos pelos macrófagos, permitindo que os fatores inflamatórios diminuam. Quando não há regulação adequada, há a liberação aumentada de NETs e seus constituintes não são removidos, tornando-se causa de patogênese (SABBATINI; MAGNELLI; RENO, 2021).

Os componentes de NETs em excesso podem levar a um estado de hipercoagulabilidade a partir do dano endotelial, da formação de agregados com plaquetas e da ativação de fatores da cascata de coagulação (Figura 8). A partir da capacidade citotóxica das NETs, podem ocorrer lesões nas células endoteliais que, pela expressão de E-, P-selectinas e fator de von Willebrand (vWF), permitem a adesão e a agregação plaquetária. Além disso, essas moléculas promovem o recrutamento de mais neutrófilos que se associam às plaquetas ativadas, contribuindo para a trombose. O DNA liberado das NETs inicia a geração de fibrina pela ativação do fator XII da coagulação, as histonas regulam a expressão de pró coagulantes como o fator tecidual e a fosfatidilserina e a EN cliva a proteína anticoagulante inibidora do fator tecidual e antitrombina (JING *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2021). A formação de trombos contribui para o aumento do processo inflamatório e para o fenômeno da vaso-oclusão, a qual atinge outros órgãos além dos pulmões, podendo causar insuficiência renal, cardíaca e hepática (ZHU; CHEN; LIU, 2022). Nesses aspectos, o dímero D, produto da degradação da fibrina, é um marcador utilizado para a identificação de coagulopatias e que se encontra elevado em pacientes com COVID-19, principalmente os que necessitam de internação (FARA *et al.*, 2021).

Figura 8 – NETs e a imunotrombose em COVID-19

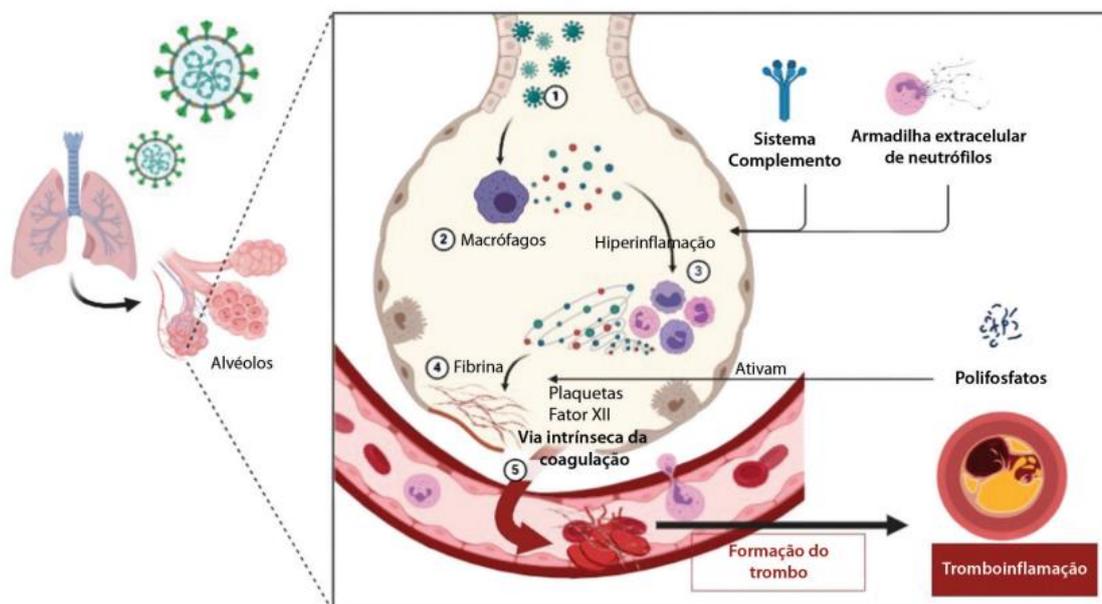


Fonte: Adaptado de Nakazawa; Ishizu (2020).

Além disso, as NETs também atuam no aumento da permeabilidade vascular. Sabe-se que histonas, proteases e demais componentes das NETs possuem elevada carga catiônica que podem levar à formação de poros e à citotoxicidade pela afinidade com membranas fosfolípídicas. As lesões de células endoteliais e epiteliais identificadas em pacientes com COVID-19 (Figura 9) condizem com a patogênese de outras doenças por NETs (BECKER *et al.*, 2021).

Entre os estados inflamatórios que possuem associação de patogênese com as NETs estão sepse, doenças autoimunes, distúrbios cardiovasculares, lesão pulmonar aguda induzida por patógenos e desenvolvimento de SRAG. Além disso, também estão envolvidas com doenças virais como influenza, sendo que elevadas quantidades de NETs estão associadas com mau prognóstico da doença (ZUO *et al.*, 2020).

Figura 9 – Neutrófilos na imunopatogênese da COVID-19: danos ao endotélio e epitélio pulmonar. (1) O SARS-CoV-2 ao se replicar em células como os (2) macrófagos, células epiteliais e endoteliais, promove dano celular e estimula a liberação de mediadores inflamatórios, que em excesso, e com a participação do sistema complemento e NETs contribuem para a (3) hiperinflamação. Os componentes de NETs liberados também atuam no dano celular, na agregação com plaquetas, ativação de fatores pró-coagulantes, culminando na formação de (4) fibrina e (5) trombos. Os trombos formados levam a fenômenos de tromboinflamação a partir da amplificação da resposta imunológica e vaso-oclusão.



Fonte: Adaptado de Nascimento *et al.* (2021).

Todo esse quadro da desregulação do sistema imunológico leva ao dano tecidual e à rápida progressão da doença (CHEN *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2020; NOTZ *et al.*, 2020). Dessa forma, levando em consideração o importante papel do sistema imunológico na patogênese da COVID-19 grave, a presença de achados laboratoriais que revelam a participação dos neutrófilos nesse processo e a capacidade das NETs de agravar estados patológicos, mostra-se relevante avaliar os marcadores de NETs em pacientes acometidos com COVID-19 no momento da admissão em UTI, assim como comparar os marcadores de acordo com o desfecho clínico de óbito e alta.

### **3 HIPÓTESES**

Os pacientes com COVID-19 grave internados em UTI e com desfecho clínico de óbito apresentam maiores níveis de marcadores de NETs no plasma em comparação com os que evoluíram para alta hospitalar.

Os pacientes com COVID-19 grave internados em UTI e com desfecho clínico de óbito apresentam características sociodemográficas, clínicas e alterações laboratoriais significativamente diferentes em comparação com os que evoluíram para a alta hospitalar.

### **4 OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo geral**

Avaliar a correlação de marcadores de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), como do perfil sociodemográfico e laboratorial, no desfecho clínico de pacientes com COVID-19 grave internados em UTI de hospital de referência para COVID-19, em Fortaleza/CE.

#### **4.2 Objetivos específicos**

- Descrever características sociodemográficas e clínicas da população estudada de acordo com sexo, idade, município de origem, presença de comorbidades e dias de internação dos casos;
- Descrever características laboratoriais da população estudada de acordo com valores de neutrófilos, leucócitos, linfócitos, monócitos, plaquetas, PCR, dímero D, NLR dos casos;
- Quantificar os níveis de mieloperoxidase, elastase, histona citrulinada e DNA livre de células no plasma de pacientes com COVID-19 grave internados em UTI;
- Comparar os dados obtidos de acordo com o desfecho clínico dos pacientes, nos grupos alta hospitalar e óbito;
- Verificar a existência de correlação entre os níveis de marcadores de NETs com as características sociodemográficas e os dados laboratoriais.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 População e descrição do estudo

Trata-se de um estudo descritivo e transversal com coleta de informações sociodemográficas, dados laboratoriais e análise de amostras biológicas coletadas nos anos de 2020 a 2021 de pacientes não vacinados para a COVID-19. Foram selecionados de forma aleatória 78 pacientes com infecção por SARS-CoV-2 diagnosticada por pesquisa de antígeno a partir de teste rápido e/ou pela detecção de RNA viral de swabs nasofaríngeos por meio do método reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) e que estiveram internados na UTI COVID-19 do Instituto Dr. José Frota, hospital de nível terciário localizado no estado do Ceará, Brasil, de Junho a Agosto de 2020 (n= 64) e de Janeiro a Fevereiro de 2021 (n=14), sendo observados os desfechos clínicos de alta ou óbito.

O principal fator considerado para a admissão em UTI foi a classificação de severidade pelo escore SAPS 3 e a necessidade de suporte respiratório invasivo, como ventilação mecânica e o uso de drogas vasoativas (LÁZARO *et al.*, 2022). O escore SAPS 3 é um sistema prognóstico composto de 20 variáveis (agrupadas em características sociodemográficas, parâmetros fisiológicos e variáveis relacionadas ao diagnóstico e presença de comorbidades), sendo utilizado para estabelecer índice preditivo de mortalidade para pacientes internados em UTI (JUNIOR *et al.*, 2010).

Dados sociodemográficos e laboratoriais foram coletados a partir da leitura de prontuários eletrônicos disponibilizados no sistema Ars Vitae do hospital. Os resultados laboratoriais e a coleta da amostra para análise dos marcadores de NETs são referentes ao dia da admissão dos pacientes na UTI.

### 5.2 Aspectos éticos

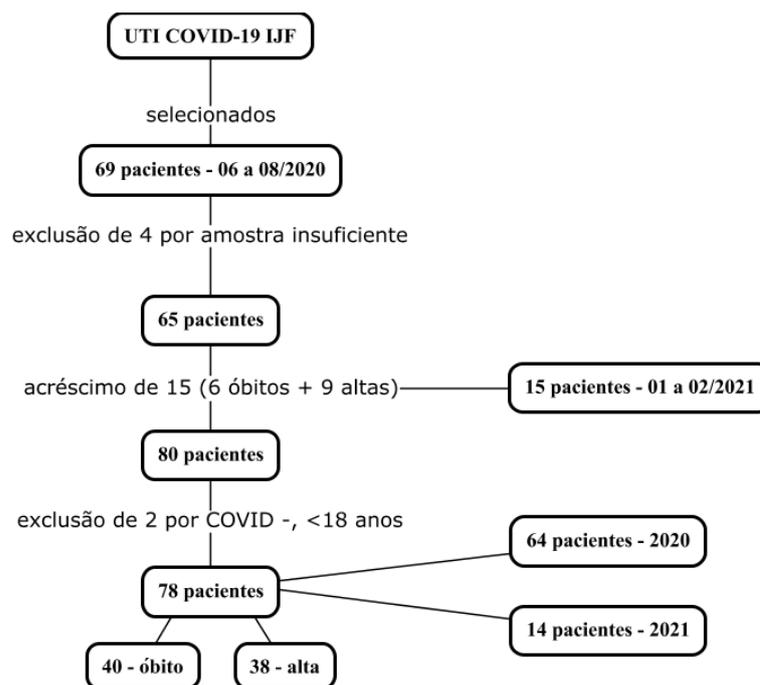
Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (UFC) por meio do protocolo nº 4.346.280 (CAAE: 36139220.6.0000.5054) (Anexo A) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) por meio do parecer nº 4.026.888 (CAAE: 30579020.4.1001.0008) (Anexo B). As amostras foram coletadas após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) pelos participantes envolvidos ou seus familiares (Anexo C).

### 5.3 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de elegibilidade do estudo foram pacientes com idade igual ou superior a 18 anos, internados em UTI, com exames laboratoriais confirmatórios da presença de SARS-CoV-2 (RT-PCR e/ou teste rápido para antígeno); manifestação da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG).

Os critérios de exclusão adotados foram indivíduos com testes inconclusivos para COVID-19, mulheres grávidas, pacientes transplantados, indivíduos em uso de imunossupressores e/ou em tratamento quimioterápico. A Figura 10 corresponde ao fluxograma de seleção dos pacientes até o número final de 78 amostras.

Figura 10 – Fluxograma da seleção amostral



### 5.4 Coleta e processamento das amostras

Amostras de sangue periférico em tubo EDTA foram coletadas dos 78 pacientes pela equipe responsável do hospital no dia da admissão em UTI. Após a coleta, foi realizada a centrifugação dos tubos e a aliquotagem dos plasmas, sendo armazenados em tubos Eppendorf em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da quantificação dos marcadores. Para evitar a degradação das

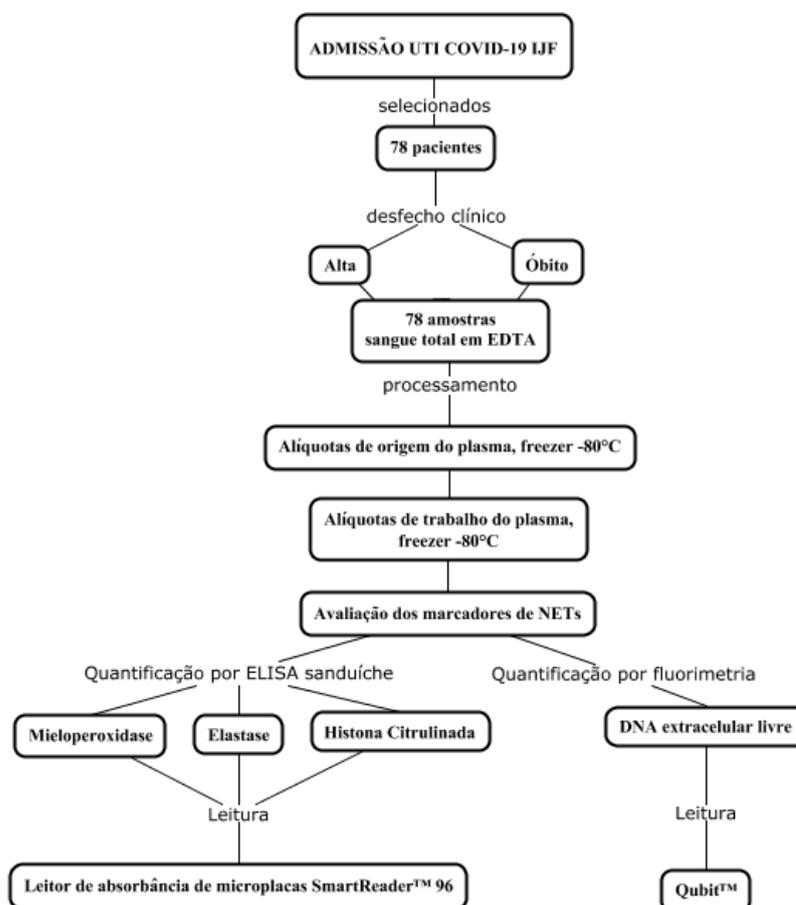
amostras pelos diferentes ciclos de congelamento e descongelamento, foram realizadas alíquotas de trabalho em Eppendorf a partir das alíquotas de origem.

Além das 78 amostras de pacientes com COVID-19, foi utilizada uma amostra de controle negativo de voluntário não infectado pelo SARS-CoV-2 ou assintomático e que não apresenta doença que possa interferir nos resultados dos biomarcadores de NETs.

## 5.5 Delineamento experimental

Na execução experimental (Figura 11), a quantificação dos marcadores de NETs foi realizada por meio de kits de ELISA sanduíche e fluorimetria da Invitrogen™ Thermo Fisher com leitura realizada pelo leitor de absorvância de microplacas SmartReader™ 96 da Accuris Instruments™ e fluorímetro Qubit® 2.0 Fluorometer, respectivamente, conforme instruções da fabricante.

Figura 11 – Fluxograma do delineamento experimental



## 5.6 Quantificação de marcadores de NETs por ELISA

Os três marcadores de NETs quantificados por ensaio imunoenzimático seguiram o mesmo princípio básico do ELISA sanduíche. O analito de interesse presente nas amostras liga-se ao anticorpo de captura específico adsorvido nos poços e ao conjugado composto pelo anticorpo de detecção específico e biotina, sendo que a essa última liga-se o complexo estreptavidina-peroxidase. Ao adicionar o substrato da peroxidase, a reação enzimática ocorre sendo formado um produto de cor proporcional à quantidade do marcador presente na amostra, sendo possível a medição da absorbância e determinação da concentração do analito de interesse. Os cálculos das concentrações dos marcadores foram realizados a partir da curva padrão, por meio da interpolação em curva log-log (absorbância x concentração) utilizando o Excel 2019 (Microsoft Office).

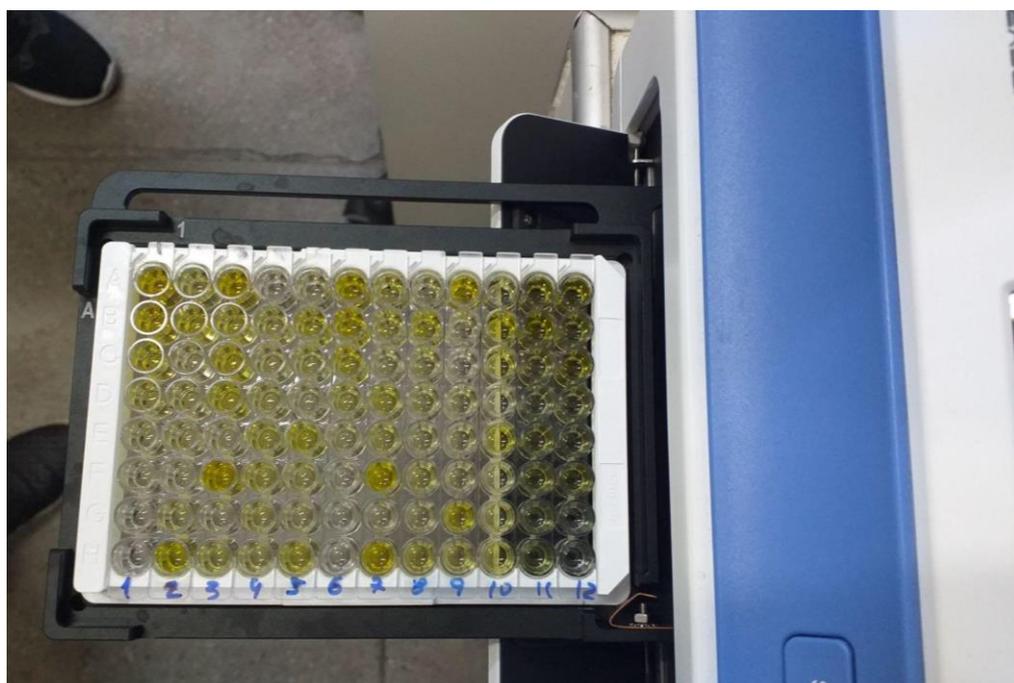
### 5.6.1 Mieloperoxidase

Para a quantificação de MPO humana nas amostras foi utilizado o kit comercial Myeloperoxidase Human Instant ELISA™ (BMS2038INST) da Invitrogen Thermo Fisher Scientific. Antes de iniciar o procedimento, as amostras foram descongeladas e diluídas (1:50) a partir de 490 µL do diluente da amostra e 10 µL da amostra, sendo homogeneizadas em vórtex (Bionex) e minicentrífuga UniSpin (Uniscience), por 10 segundos em cada, antes de adicionadas na placa. Os 96 poços da microplaca fornecida pelo kit eram sensibilizados com anticorpos monoclonais específicos para MPO humana além de conterem o conjugado com biotina, o complexo estreptavidina-HRP e o diluente da amostra liofilizados. Os poços referentes à curva padrão eram constituídos também dos padrões liofilizados (duplicata) em concentração de 10.000 - 156 pg/mL. O tampão de lavagem concentrado 10x (solução salina tamponada com fosfato com 1% de detergente Tween® 20) foi diluído em 475 mL de água destilada.

O procedimento foi iniciado com a adição 150 µL de água destilada nos poços da curva padrão e branco e 100 µL de água destilada nos poços das amostras para a reconstituição dos reagentes liofilizados. Foram adicionados 50 µL das amostras diluídas 1:50 nos poços correspondentes, a placa foi selada e incubada à temperatura ambiente (18 a 25°C), a 200 rpm, por três horas em shaker de microplacas Orbi-Shaker™ MP. Após a incubação foi realizada a etapa de lavagem manual dos poços, a partir de 350 µL de tampão de lavagem em cada poço,

quatro vezes. A cada lavagem o conteúdo dos poços foi desprezado na pia e os resíduos de tampão na placa secados por batidas em papel toalha. Foram adicionados 100  $\mu$ L de solução de substrato cromogênica Tetrametilbenzidina (TMB) em todos os poços, sendo a placa levada para incubação à temperatura ambiente, por 10 minutos, protegida de fonte luminosa. Por fim, foram adicionados 100  $\mu$ L de solução de parada (ácido fosfórico 1M) em cada poço e a placa foi lida pelo leitor de absorvância (Figura 12), utilizando o comprimento de onda de 450 nm.

Figura 12 – Leitura da placa de 96 poços em espectrofotômetro



Fonte: Fotografado pela autora.

### 5.6.2 Elastase

Para a quantificação da EN humana nas amostras de plasma foi utilizado o kit comercial Human PMN-Elastase ELISA™ (BMS269) da Invitrogen Thermo Fisher Scientific. Antes de iniciar o procedimento as amostras foram descongeladas e diluídas (1:100) em duas etapas, a primeira a partir de 90  $\mu$ L do diluente e 10  $\mu$ L da amostra e a segunda com 450  $\mu$ L do diluente e 50  $\mu$ L da amostra. As amostras diluídas foram homogeneizadas em vórtex (Bionex) e minicentrífuga UniSpin (Uniscience), por 10 segundos em cada, antes de adicionadas na placa. Os 96 poços da microplaca fornecida pelo kit eram sensibilizados com anticorpos específicos para elastase de PMN humana. Para a preparação da curva, foram feitas diluições seriadas do padrão liofilizado (10 ng/mL) reconstituído com 2000  $\mu$ L de diluente da amostra,

de forma que o intervalo da curva padrão foi de 10 - 0,16 ng/mL. Além do padrão, o kit forneceu o controle de alta concentração o qual foi reconstituído em 1000  $\mu$ L do diluente. O tampão de lavagem concentrado 10x (solução salina tamponada com fosfato com 1% de detergente Tween® 20) foi diluído em 450 mL de água destilada.

O procedimento foi iniciado com a adição de 100  $\mu$ L dos padrões (duplicata), 100  $\mu$ L de diluente no branco (duplicata) e 100  $\mu$ L de das amostras diluídas 1:100/controle nos seus respectivos poços. A placa foi selada e incubada à temperatura ambiente, a 900 rpm, por uma hora, em shaker de microplacas Orbi-Shaker™ MP. Após a incubação foi realizada a etapa de lavagem dos poços pela lavadora de Microplacas Wellwash Versa (Figura 13), a partir de 350  $\mu$ L de tampão de lavagem em cada poço, quatro vezes. A cada lavagem o conteúdo dos poços foi aspirado pela lavadora e após a última lavagem, os resíduos de tampão na placa foram secados por batidas em papel toalha. Foram adicionados 150  $\mu$ L do conjugado-HRP nos poços, sendo a placa selada e incubada à temperatura ambiente, a 900 rpm, por uma hora em shaker.

Após incubação, a placa foi lavada mais quatro vezes conforme anteriormente descrito e foram adicionados 200  $\mu$ L de TMB em todos os poços. A placa foi levada para incubação à temperatura ambiente, por 20 minutos, sendo protegida de fonte luminosa. Por fim, foram adicionados 50  $\mu$ L de solução de parada (ácido hidrocloreico 2M) em cada poço e a placa foi lida pelo leitor de absorvância, utilizando o comprimento de onda de 450 nm.

Figura 13 – Etapa de lavagem automatizada da placa de 96 poços



Fonte: Fotografado pela autora.

### 5.6.3 Histona H3 Citrulinada

Para a quantificação da histona H3 citrulinada nas amostras de plasma foi utilizado o kit comercial Citrullinated Histone H3 (Clone 11D3) ELISA™ (501620) da Cayman Chemical. Antes de iniciar o procedimento as amostras foram descongeladas e diluídas (1:2) a partir de 60 µL do diluente e 60 µL da amostra. As amostras diluídas foram homogeneizadas em vórtex (Bionex) e minicentrífuga UniSpin (Uniscience), por 10 segundos em cada, antes de adicionadas na placa. Os 96 poços da microplaca fornecida pelo kit eram sensibilizados com anticorpos monoclonais específicos para histona H3 citrulinada nos resíduos R2, R8 e R17. O tampão de ensaio concentrado (10x) foi diluído com 90 mL de água, sendo adicionados 100 µL do estabilizante polissorbato 20. Para a preparação da curva, foram feitas diluições seriadas do padrão liofilizado (500 ng/mL) reconstituído com 2 mL do tampão de ensaio, de forma que o intervalo da curva padrão foi de 10 - 0,15 ng/mL. O tampão de lavagem concentrado 400x foi diluído em volume total de 1 L de água destilada. O conjugado-HRP concentrado (10x) fornecido foi diluído a partir de 1,2 mL do conjugado e 10,8 mL do tampão de ensaio.

O procedimento foi iniciado com a adição de 100 µL dos padrões (duplicata), 100 µL de tampão de ensaio no branco (duplicata) e 100 µL das amostras diluídas 1:2 nos seus respectivos poços. A placa foi selada e incubada à temperatura ambiente, a 300 rpm, por duas horas, em shaker de microplacas Orbi-Shaker™ MP. Após a incubação foi realizada a etapa de lavagem dos poços pela lavadora de Microplacas Wellwash Versa, a partir de 300 µL de tampão de lavagem em cada poço, cinco vezes. A cada lavagem o conteúdo dos poços foi aspirado pela lavadora e após a última lavagem, os resíduos de tampão na placa foram secados por batidas em papel toalha. Foram adicionados 100 µL do conjugado-HRP nos poços, sendo a placa selada e incubada à temperatura ambiente a 300 rpm por uma hora em shaker. Após incubação, a placa foi lavada mais cinco vezes conforme anteriormente descrito e foram adicionados 100 µL de TMB em todos os poços. A placa foi levada para incubação em shaker, à temperatura ambiente, por 30 minutos, protegida de fonte luminosa. Por fim, foram adicionados 100 µL de solução de parada em cada poço (Figura 14) e a placa foi lida pelo leitor de absorvância, utilizando o comprimento de onda de 450 nm.

Figura 14 – Etapa de pipetagem da solução de parada nos 96 poços da placa. Com a adição da solução de parada (ácido), ocorre a interrupção da reação enzimática e, com o Ph da solução alterado, há a mudança da cor azul para amarelo, que absorve luz a 450 nm



Fonte: Acervo pessoal.

## **5.7 Quantificação de marcador de NETs por Fluorimetria**

### **5.7.1 DNA livre de células**

A quantificação do cfDNA das amostras de plasma foi realizada utilizando a fluorimetria. Nessa metodologia foi adicionado ao plasma o corante fluorescente Qubit® dsDNA HS Reagent (Component A) que se liga especificamente ao ácido nucléico livre de dupla fita presente na amostra. Após, com o emprego de um fluorômetro, a fluorescência emitida foi detectada, sendo diretamente proporcional à quantidade de cfDNA do plasma analisado. O kit utilizado para esse fim foi o Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kits (Q33230, Q33231) da Invitrogen Thermo Fisher Scientific, o qual permite a quantificação do DNA de dupla fita livre com alta sensibilidade (1 ng/mL a 500 ng/mL). O fluorímetro utilizado foi o Qubit 2.0® da mesma fabricante do kit. A quantidade de amostra a ser utilizada pode variar de 1 a 20  $\mu\text{L}$ , sendo optado pelo uso de 2  $\mu\text{L}$ .

Para o ensaio, os reagentes foram colocados à temperatura ambiente e as amostras foram descongeladas em gelo. A solução de trabalho foi preparada a partir da diluição 1:200 do corante fluorescente com o tampão fornecido pelo kit. Sendo assim, para os 80 tubos (78 amostras + 2 padrões de calibração do kit), foram pipetados 15.920  $\mu\text{L}$  de tampão e 80  $\mu\text{L}$  do reagente em um tubo falcon. A solução de trabalho foi levada ao vórtex (Bionex) por 10 segundos e utilizada para preparar 200  $\mu\text{L}$  de solução final a partir da adição dos padrões (Qubit® dsDNA HS Standard #1 e #2) e das amostras. Os padrões foram utilizados para a

calibração do equipamento, sendo o padrão #1 de concentração igual a 0 ng/μL e o padrão #2 de concentração igual a 10 ng/μL.

Dessa forma, foram adicionados em eppendorfs específicos (Axygen® PCR-05-C tubes) 190 μL de solução de trabalho e 10 μL de padrão nos tubos dos padrões e 198 μL de solução de trabalho e 2 μL de amostra nos tubos das amostras. Os 80 tubos foram levados ao vórtex e minicentrífuga UniSpin (Uniscience) por 3 segundos em cada. Após dois minutos de repouso dos tubos, estes foram lidos pelo Qubit 2.0® (Figura 15), sendo realizada primeiro a calibração do aparelho com os padrões e depois os tubos das amostras foram, um a um, lidos e o cfDNA quantificado. Os valores foram emitidos em ng/μL e as concentrações foram calculadas, pelo próprio equipamento, de acordo com a diluição e o volume de amostra, com base na fórmula: valor emitido x 200/volume de amostra.

Figura 15 – Etapa de leitura dos tubos em Fluorímetro Qubit 2.0® para quantificação do cfDNA



Fonte: Fotografado pela autora.

## 5.8 Análises Estatísticas

As análises estatísticas e gráficas foram realizadas a partir do software GraphPad Prism versão 8.0.1. O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para avaliação da normalidade da distribuição. As variáveis categóricas não paramétricas foram expressas em frequência absoluta e relativa e testadas quanto às diferenças estatísticas por meio do teste qui-quadrado de Pearson e teste de Fisher. As variáveis contínuas não paramétricas foram apresentadas como mediana e intervalo interquartil (IQR) e os dados foram comparados pelo teste U de *Mann-Whitney*.

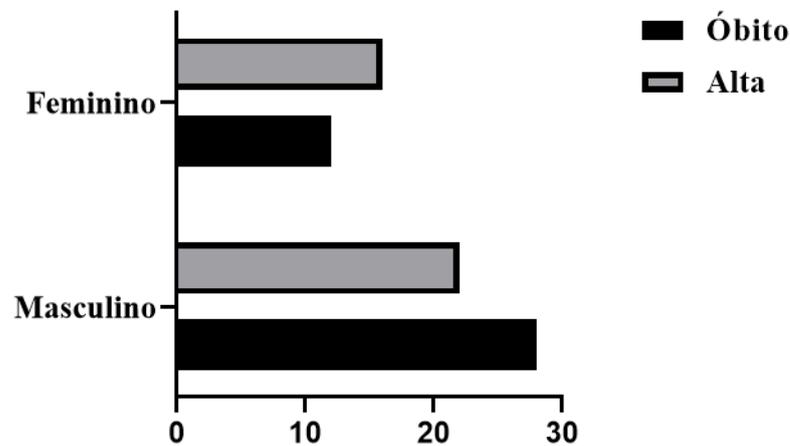
Para explorar as correlações entre os marcadores de NETs, foram realizadas as análises de correlação de Spearman devido às distribuições não normais dessas variáveis. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos sempre que o valor de p obtido fosse inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Dados sociodemográficos, clínicos e laboratoriais

Foram obtidas 78 amostras de plasma coletadas na admissão em UTI de pacientes com COVID-19 de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. Dos 78 pacientes, 40 (51,2%) foram a óbito e 38 (48,8%) tiveram desfecho clínico de alta hospitalar. Do total, 64,1% dos indivíduos eram do sexo masculino (50/78) e 35,9% eram do sexo feminino (28/78). Dos 50 pacientes do sexo masculino, 28 (56%) evoluíram para o óbito; enquanto das 28 pacientes do sexo feminino, 16 (57,14%) receberam alta (Gráfico 1).

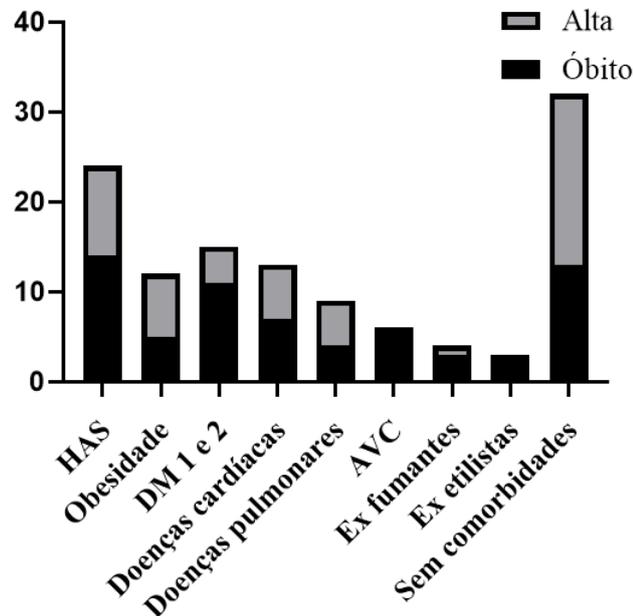
Gráfico 1 – Distribuição dos pacientes por sexo e desfecho clínico



Fonte: Elaborado pela autora.

Com relação à faixa etária, a mediana de idade foi de 59 (22-97), sendo que os pacientes acima da mediana de idade predominaram no desfecho de óbito (26) em comparação com o grupo de alta (12). A mediana dos dias de hospitalização foi de 12 (1-83). De acordo com o município de residência, 65 (83,33%) dos pacientes eram de Fortaleza, sendo os demais de Maracanaú (2), Beberibe, Madalena, Aracoiaba, Paraipaba, Itapajé, Tauá, Pacajus, Caucaia, Tururu, Pentecostes, Quixeramobim. A maioria dos pacientes (53,85%) apresentava comorbidades (Gráfico 2), sendo a hipertensão arterial a mais frequente (30,7%). Dos pacientes sem comorbidades, a maioria recebeu alta (59,37%). Ao associar as variáveis categóricas de comorbidades, os testes Qui-quadrado de Pearson e Fisher mostraram associação estatisticamente significativa entre os grupos com AVC e sem comorbidades ( $p=0,0076$ ) tanto para os desfechos de alta quanto de óbito. Os dados sociodemográficos e clínicos são descritos na Tabela 1.

Gráfico 2 – Distribuição dos pacientes por comorbidade e desfecho clínico



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 1 – Características sociodemográficas e clínicas dos 78 pacientes com COVID-19 internados em UTI do IJF, Fortaleza/CE, em 2020/2021

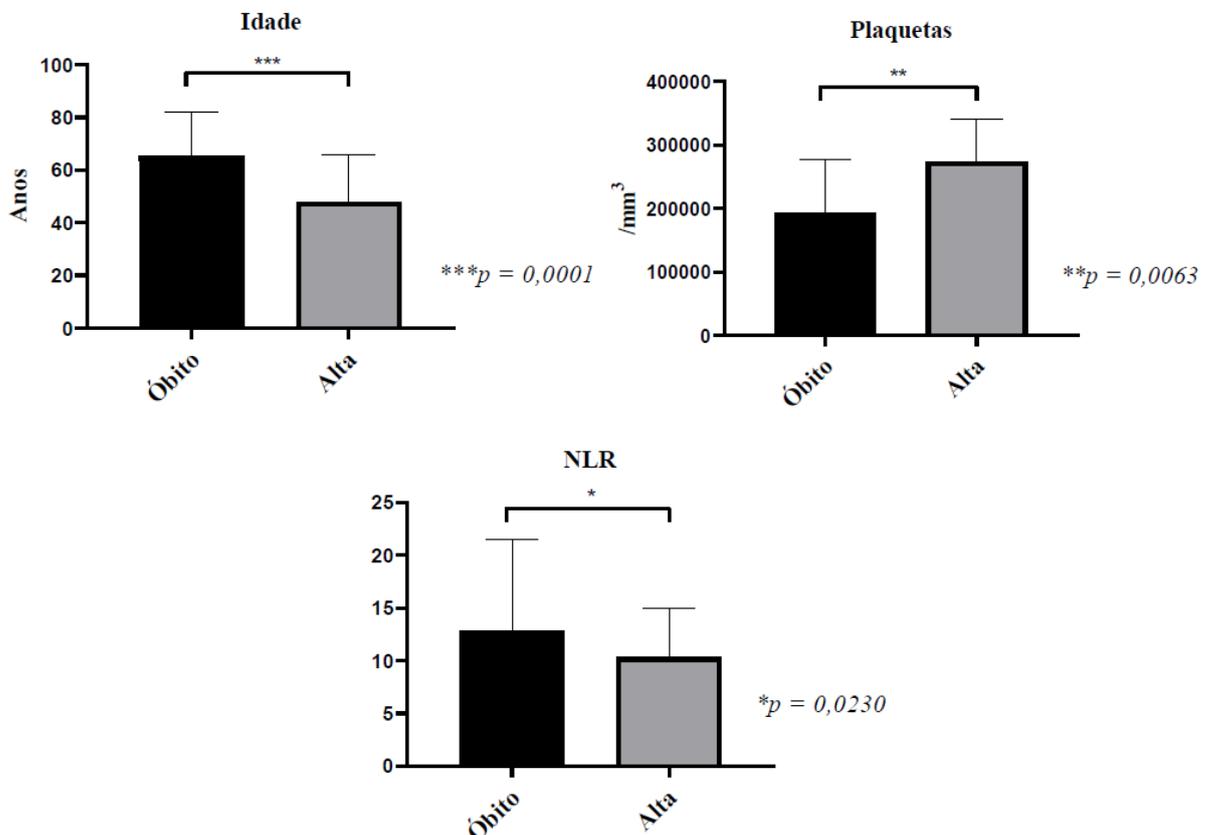
Características	Desfecho clínico		Total (78)	p
	Óbito (40)	Alta (38)		
<b>Sexo*</b>				0,2653
Masculino	28 (70%)	22 (57,9%)	50 (64,1%)	
Feminino	12 (30%)	16 (42,1%)	28 (35,9%)	
<b>Idade**</b>	69,50 (55-76)	41 (32-62,2)	59 (38-74)	<b>0,0001</b>
<b>Município*</b>				0,1343
Fortaleza	36 (90%)	29 (76,31%)	65 (83,33%)	
Outros	4 (10%)	9 (23,68%)	13 (16,67%)	
<b>Comorbidades*</b>				
Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS)	14 (35%)	10 (26,3%)	24 (30,7%)	0,1894
Obesidade/Sobrepeso	5 (12,5%)	7 (18,4%)	12 (15,4%)	0,9501
Diabetes Mellitus (DM 1 e 2)	11 (27,5%)	4 (10,5%)	15 (19,2%)	0,0599
Doenças cardíacas	7 (17,5%)	6 (15,8%)	13 (16,7%)	0,4185
Doenças pulmonares	4 (10%)	5 (13,2%)	9 (11,5%)	>0,999
Acidente Vascular Cerebral (AVC)	6 (15%)	0	6 (7,7%)	<b>0,0197</b>

Ex fumantes	3 (7,5%)	1 (2,6%)	4 (5,1%)	0,3033
Ex etilistas	3 (7,5%)	0	3 (3,8%)	0,0856
Outras	5 (12,5%)	4 (10,5%)	9 (11,5%)	0,4710
<b>Sem comorbidades</b>	13 (32,5%)	19 (50%)	32 (41%)	<b>0,0441</b>
<b>Dias de hospitalização**</b>	10 (6-26)	14,50 (7-32)	12 (7-28,5)	0,2422

Fonte: Elaborada pela autora. Teste de Mann-Whitney para variáveis contínuas (óbito x alta). Teste de Fisher e Qui-quadrado de Pearson para variáveis categóricas (óbito x alta). \* Freqüência absoluta (relativa). \*\*Mediana (IQR).

Na comparação entre os desfechos clínicos, as variáveis de idade, concentração de plaquetas e NLR revelaram diferença estatística. Dessa forma, os pacientes que foram a óbito eram mais velhos (mediana: 69,50; IQR: 55-76), apresentaram menor concentração de plaquetas (mediana:  $193,5 \times 10^3/\text{mm}^3$ ; IQR:  $154-278 \times 10^3/\text{mm}^3$ ) e maior NLR (mediana: 12,79; IQR: 9,21-21,44) quando comparados com os casos de alta (Gráfico 3). Os demais dados laboratoriais são mostrados na Tabela 2.

Gráfico 3 – Comparações entre desfechos clínicos com significância estatística (mediana com IQR)



Fonte: Elaborado pela autora. Teste de Mann-Whitney (idade: \*\*\*p=0,0001; plaquetas: \*\*p=0,0063; NLR: \*p=0,0230).

Tabela 2 – Dados laboratoriais dos 78 pacientes com COVID-19 internados em UTI do IJF, Fortaleza/CE, em 2020/2021. Mediana (IQR)

Dados	Desfecho clínico		Total (78)	Referência	p
	Óbito (40)	Alta (38)			
<b>PCR</b>	142,3 (73,8-193)	109,7 (18,9-194)	133,1 (43,13-192)	até 3 mg/L	0,3716
<b>Dímero D*</b>	2,46 (1,83-9,98)	2,3 (1,02-8,73)	2,42 (1,24-9,07)	< 0,5 mg/L	0,3257
<b>Leucócitos totais</b>	14,14 (9,28-20,12)	13,05 (9,11-17,80)	13,61 (9,22-18,91)	4-10x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	0,5277
<b>Neutrófilos</b>	12,55 (8,36-18,35)	10,72 (6,75-16,16)	12,23 (6,96-17,25)	1,6-8x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	0,3267
<b>Linfócitos</b>	0,8 (0,55-1,44)	1,08 (0,79-1,75)	0,99 (0,69 - 1,53)	1-3x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	0,0714
<b>NLR</b>	12,79 (9,21-21,44)	10,33 (5,84-15,01)	11,79 (7,77-16,4)	-	<b>0,0230</b>
<b>Monócitos</b>	0,45 (0,29-0,64)	0,55 (0,39-0,74)	0,53 (0,34-0,71)	0-0,8x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	0,1694
<b>Plaquetas</b>	193,5 (154-278)	274,5 (207-342)	235,5 (168-327,5)	150-400x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	<b>0,0063</b>

Fonte: Elaborada pela autora. Teste de Mann-Whitney (óbito x alta). \*Dímero D (n óbito = 32; n alta = 33).

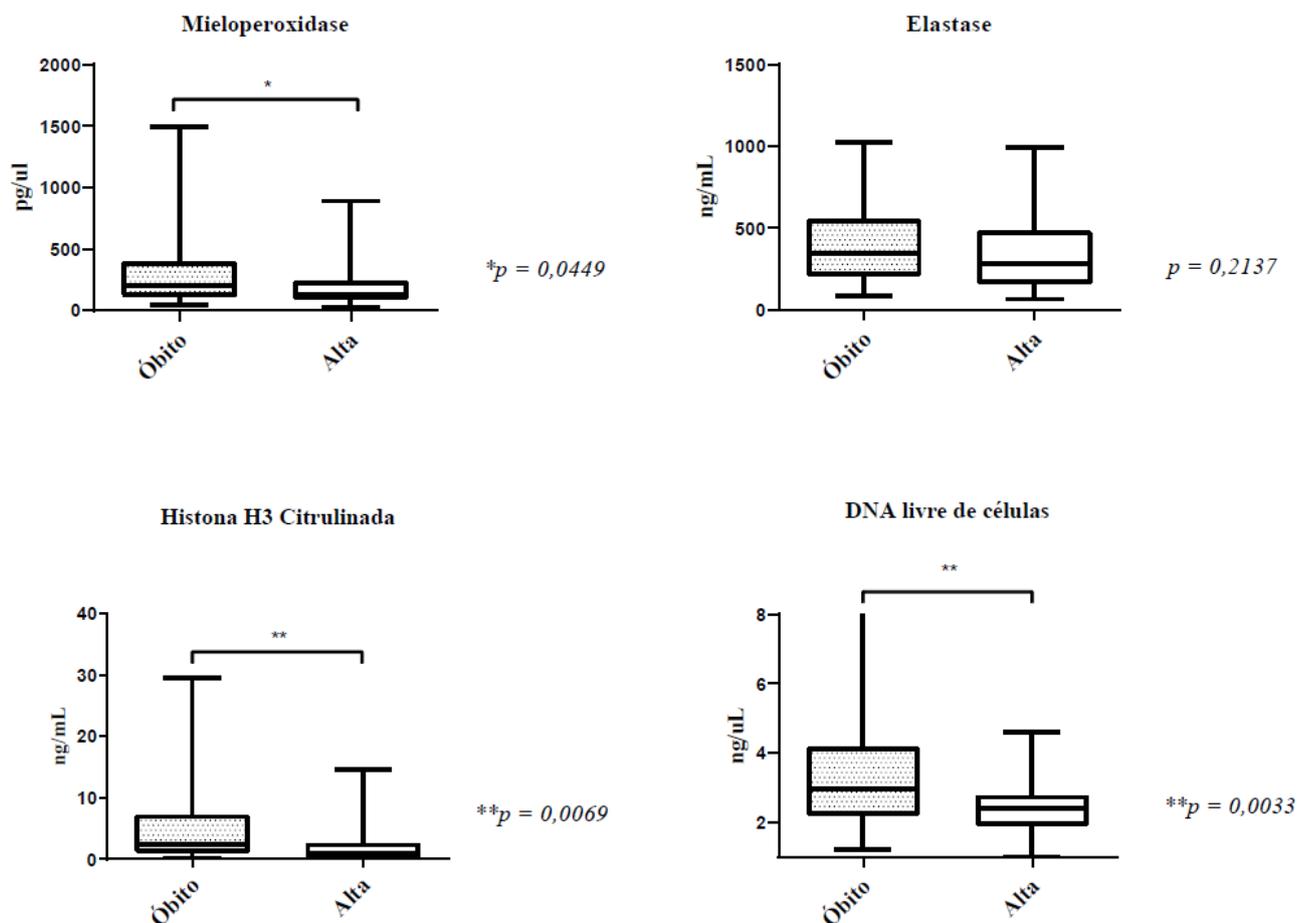
## 6.2 NETs

### 6.2.1 Análises de comparação

Análises de comparação foram realizadas para os quatro marcadores dosados (Gráfico 4). A partir da análise da MPO nas amostras dos pacientes obteve-se uma dosagem significativamente maior (p=0,0449) desse biomarcador no desfecho de óbito (mediana: 200,6; IQR: 118-399,1) quando comparada ao desfecho de alta (mediana: 131,96; IQR: 87,19-240,7). Para a EN foi obtida uma dosagem não significativamente maior (p=0,2137) no desfecho de óbito (mediana: 343,9; IQR: 212,2-551,8) quando comparada ao desfecho de alta (mediana: 281,1; IQR: 160,3-482). As dosagens da H3Cit foram significativamente maiores (p=0,0069)

no desfecho de óbito (mediana: 1,459; IQR: 1,067-7,211) quando comparadas ao desfecho de alta (mediana: 1,097; IQR: 0,2983-2,630). Por fim, na quantificação do cfDNA foi obtida concentração significativamente maior ( $p=0,0033$ ) desse biomarcador no grupo de óbito (mediana: 2,96 IQR: 2,21-4,16) quando comparado ao grupo de alta (mediana: 2,42; IQR: 1,92-2,77). Foram realizadas comparações dos quatro marcadores em grupos de idade e sexo, sendo que H3Cit foi significativamente maior ( $p=0,0167$ ) no grupo >65 anos (mediana: 2,98; IQR: 0,87-5,48) quando comparada ao grupo com <65 anos (mediana: 1,09; IQR: 0,31-2,63). Nas análises entre os demais marcadores e grupos não houve diferença significativa (Tabela 3).

Gráfico 4 – Comparações das dosagens de MPO, EN, H3Cit e cfDNA em plasma de pacientes com COVID-19 grave a partir do desfecho clínico (mediana com IQR)



Fonte: Elaborado pela autora. Teste de Mann-Whitney (MPO: \* $p=0,0449$ ; EN:  $p=0,2137$ ; H3Cit: \*\* $p=0,0069$ ; cfDNA: \* $p=0,0033$ ). MPO, EN, cfDNA (n óbito = 40; n alta = 38); H3Cit (n óbito = 34; n alta = 37).

Tabela 3 - Quantificação dos biomarcadores de NETs dos 78 pacientes com COVID-19 internados em UTI do IJF, Fortaleza/CE, em 2020/2021. Mediana (IQR)

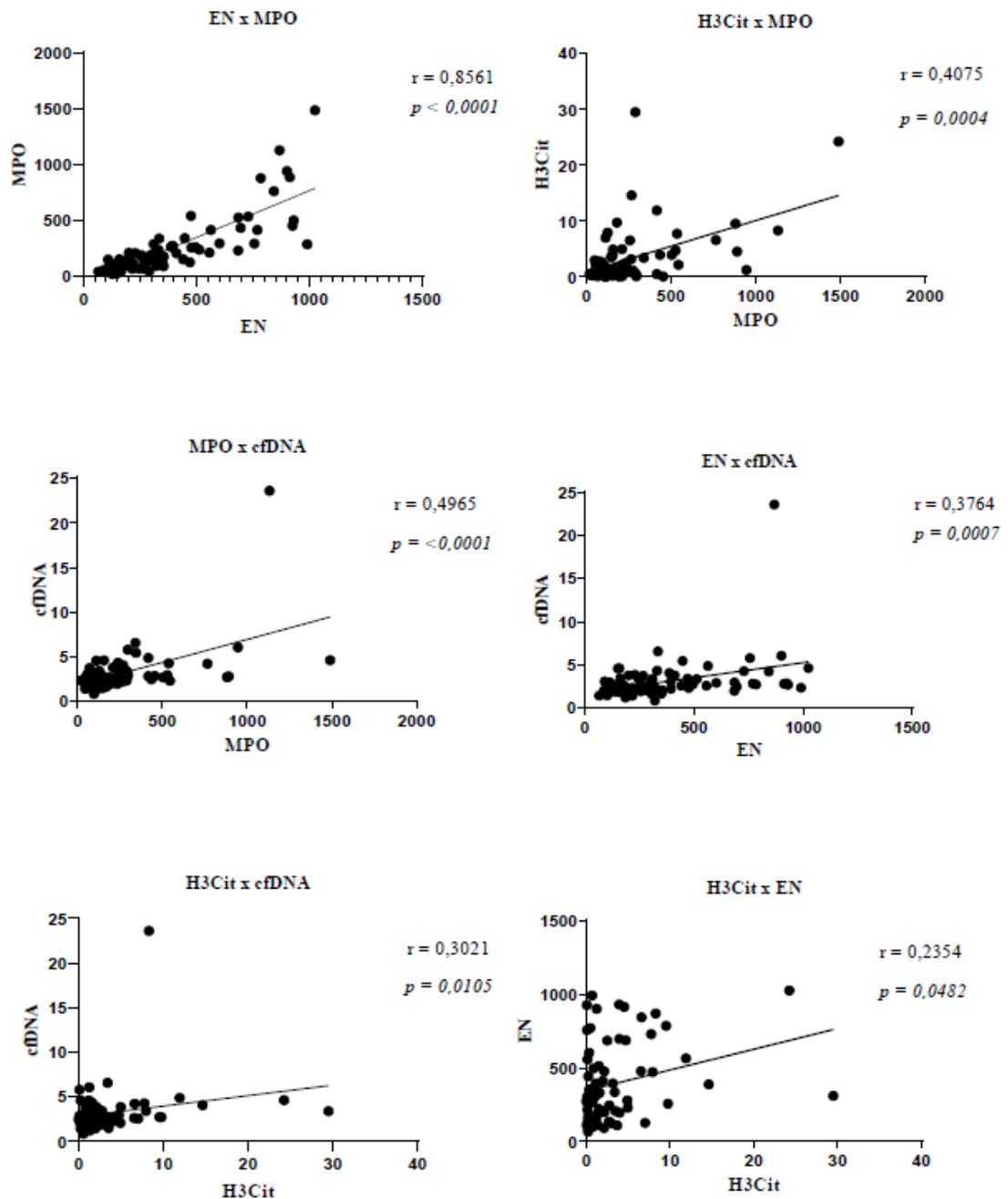
	Biomarcadores de NETs			
	MPO	EN	H3Cit	cfDNA
<b>Desfecho</b>				
Óbito	200,6 (118-399,1)	343,9 (212,2-551,8)	1,459 (1,067-7,211)	2,96 (2,208-4,160)
Alta	131,9 (87,19-240,7)	281,1 (160,3-482)	1,097 (0,2983-2,630)	2,42 (1,923-2,775)
p	<b>0,0449</b>	0,2137	<b>0,0069</b>	<b>0,0033</b>
<b>Sexo</b>				
Masculino	167,3 (100,2-291,3)	312,1 (203,8-574,2)	1,33 (0,4-4,36)	2,52 (1,98-3,17)
Feminino	153,3 (96,96-267,5)	310,9 (153,5-475,3)	2,08 (0,37-3,75)	2,77 (2,25-3,80)
p	0,83	0,5812	0,8149	0,2959
<b>Idade</b>				
<65 anos	154,2 (92-243,6)	317,5 (180,3-454,2)	1,09 (0,31-2,63)	2,52 (1,98-3,54)
>65 anos	212,1 (115,3-431,1)	305 (189,8-665,4)	2,98 (0,87-5,48)	2,77 (2,25-3,40)
p	0,1006	0,7332	<b>0,0167</b>	0,3858

Fonte: Elaborada pela autora. Teste de Mann-Whitney. MPO, EN e cfDNA (n óbito = 40, n alta = 38; n masculino = 50, n feminino = 28; n<65 = 46, n>65 = 32); H3Cit (n óbito = 34, n alta = 37; n masculino = 45, n feminino = 26; n<65 = 41, n>65 = 30).

### 6.2.2 Análises de correlação

Nas análises de correlação entre os marcadores de NETs dosados (Gráfico 5), houve correlação positiva forte entre EN e MPO ( $p < 0,0001$ ;  $r = 0,8561$ ), correlação positiva moderada entre H3Cit e MPO ( $p < 0,0004$ ;  $r = 0,4075$ ), e MPO e cfDNA ( $p = 0,0001$ ;  $r = 0,4965$ ). Correlações positivas fracas foram encontradas entre EN e cfDNA ( $p = 0,0007$ ;  $r = 0,3764$ ), H3Cit e cfDNA ( $p = 0,0105$ ;  $r = 0,3021$ ), e H3Cit e EN ( $p = 0,0482$ ;  $r = 0,2354$ ).

Gráfico 5 – Correlações entre marcadores de NETs dosados: MPO, EN, H3Cit e cfDNA

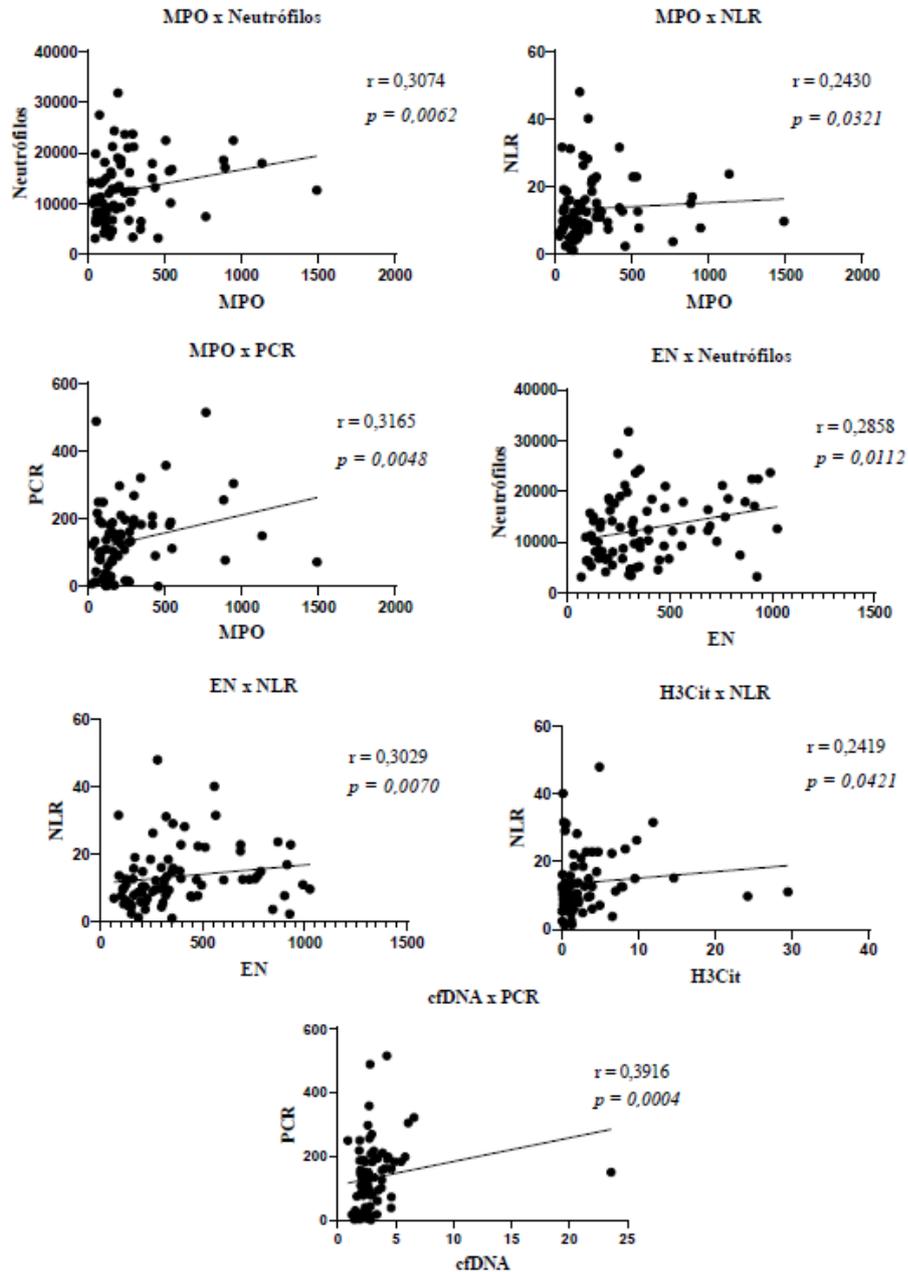


Fonte: Elaborado pela autora. Teste de correlação de Spearman. MPO, EN e cfDNA (n = 78); H3Cit (n = 71).

Além disso, foram realizadas análises de correlação entre os marcadores de NETs e os dados laboratoriais (Gráfico 6). A MPO apresentou correlação positiva fraca com os neutrófilos ( $p=0,0062$ ;  $r= 0,3074$ ), NLR ( $p=0,0321$ ;  $r=0,2430$ ) e PCR ( $p=0,0048$ ;  $r=0,3165$ ). A EN apresentou correlação positiva fraca com os neutrófilos ( $p=0,0112$ ;  $r=0,2858$ ) e NLR

( $p=0,0070$ ;  $r=0,3029$ ). Por fim, a H3Cit e o cfDNA apresentaram correlações positivas fracas com NLR ( $p=0,0421$ ;  $r=0,2419$ ) e PCR ( $p=0,0112$ ;  $r=0,3178$ ), respectivamente.

Gráfico 6 - Correlações entre os marcadores de NETs e dados laboratoriais



Fonte: Elaborado pela autora. Teste de correlação de Spearman. MPO, EN, cfDNA ( $n = 78$ ); Histona H3 Citrulínada ( $n = 71$ ).

### 6.3 Resumo dos resultados

- Predominaram casos provenientes do município de Fortaleza e do sexo masculino;
- Os pacientes acima da mediana de idade (59) predominaram no desfecho de óbito em comparação ao grupo de alta hospitalar;
- Dos pacientes do sexo masculino, a maioria evoluiu para o óbito; dos pacientes do sexo feminino a maioria evoluiu para a alta hospitalar;
- Os pacientes que foram a óbito apresentaram maior mediana de idade, menor concentração de plaquetas e maior NLR;
- A hipertensão arterial foi a comorbidade mais frequente considerando os 78 pacientes;
- Houve elevação significativa do biomarcador MPO, H3Cit e cfDNA nos pacientes que foram a óbito;
- Houve correlação entre MPO e PCR, NLR e neutrófilos, assim como entre esta e os demais marcadores de NETs dosados (EN, H3Cit e cfDNA);
- Houve correlação entre EN e neutrófilos e NLR, assim como entre esta e os demais marcadores de NETs dosados (MPO, H3Cit e cfDNA);
- Houve correlação entre H3Cit e NLR, e entre esta e os demais marcadores de NETs dosados (MPO, EN e cfDNA);
- Houve correlação entre cfDNA e PCR, e entre este e os demais marcadores de NETs dosados (MPO, EN e H3Cit).

## 7. DISCUSSÃO

A pandemia da COVID-19 impactou negativamente os contextos sociais, econômicos e de saúde. Os casos graves da doença podem evoluir para SRAG, falência múltipla dos órgãos e óbito. Diferentes estudos relatam fatores de mau prognóstico para esta parcela dos infectados pelo vírus. Em junho de 2020, após três meses da declaração da COVID-19 como pandemia, foi relatada pela primeira vez na literatura a presença de níveis elevados de constituintes de NETs (cfDNA, MPO-DNA, H3Cit) em soros de pacientes com a doença quando comparados com os de controles saudáveis. Além disso, as amostras foram capazes de estimular neutrófilos controle a produzir NETs (ZUO *et al.*, 2020). Os achados de neutrofilia e elevação da NLR associados aos resultados dos estudos com NETs, impõem à contribuição desse mecanismo no agravamento dos pacientes. Huckriede *et al.* (2021), em estudo conduzido na Suécia, relataram níveis de H3Cit, MPO e complexo DNA-MPO significativamente aumentados em plasma de pacientes admitidos com COVID-19 em UTI quando comparados

com amostras de controle. Entretanto, pouco é relatado sobre a influência das NETs no desfecho clínico da COVID-19 grave.

No presente estudo, foi dado foco à COVID-19 em sua forma grave, sendo avaliadas amostras de plasma da admissão de pacientes em UTI. Dos quatro marcadores indicativos de NETs dosados, encontramos três (MPO, H3Cit e cfDNA) deles mais elevados no grupo de óbito em comparação com os que evoluíram para alta hospitalar. Este achado corrobora com os resultados de Ng *et al.* (2021), em que níveis elevados dos marcadores dosados (H3Cit-DNA, cfDNA e EN) foram encontrados no plasma de admissão em UTI de pacientes que não sobreviveram, em comparação com os que sobreviveram. Em Prével *et al.* (2022) as concentrações de cfDNA e do complexo MPO-DNA, mas não de H3Cit, medidos em pacientes com COVID-19 grave após a admissão na UTI foram significativamente maiores em não sobreviventes do que nos sobreviventes. Nosso estudo expande os resultados expostos pela quantificação de quatro constituintes de NETs e pelo maior tamanho amostral do grupo de óbitos. Em Kinnare *et al.* (2021) foi observada tendência de maior liberação da enzima elastase em pacientes com COVID-19 moderada a grave. Curiosamente, aqui não foram encontrados níveis significativamente diferentes entre os grupos para a EN. Isso pode ser explicado pela influência da degradação do componente na amostra ou pela presença elevada da EN nos dois desfechos, tendo em vista o contexto grave dos pacientes em questão.

Os níveis plasmáticos de MPO correlacionaram-se fortemente ( $r=0,86$ ) com EN, mostrando uma importante indicação de presença de NETs nas amostras, considerando a participação conjunta dessas enzimas na formação de NETs (MORIMONT *et al.*, 2022). Além disso, a MPO e a EN também mostraram estar correlacionadas à H3Cit, cfDNA e aos neutrófilos. As correlações positivas encontradas entre a maioria dos marcadores corroboram com os resultados da literatura (HUCKRIEDE *et al.*, 2021). Como os marcadores foram dosados separadamente, a existência de correlação entre eles é importante para indicar que fazem parte do mesmo processo. No estudo de Ng *et al.* (2021), os níveis plasmáticos de H3Cit-DNA correlacionaram-se com cfDNA e EN. Como esperado, aqui H3Cit mostrou correlação com cfDNA, e com os demais marcadores. Este achado da associação entre H3Cit e cfDNA aponta para a presença de cfDNA relacionada às NETs uma vez que o cfDNA liberado pode ser originado de diferentes fontes além de NETs, como apoptose e necrose (ZUO *et al.*, 2020; HAN; LO, 2021).

Com relação aos dados laboratoriais, por se tratarem de pacientes graves, a maioria dos parâmetros estavam fora dos valores de referência tanto no grupo de óbito quanto no de

alta, sendo que houve diferença significativa na comparação entre os grupos para a NLR e as plaquetas. A NLR é descrita como fator de mau prognóstico na COVID-19, refletindo a neutrofilia associada à linfopenia encontrada nos indivíduos infectados (MURALIDHARAN; WYATT; REID, 2022). Na análise de correlação, três marcadores de NETs (MPO, EN e H3Cit) mostraram correlação com NLR, indicando não apenas a presença elevada de neutrófilos na COVID-19 grave, como também a liberação de NETs por estas células. Sobre a plaquetopenia, esta alteração é relatada em pacientes graves, a qual no contexto de NETs pode ser explicada pela formação dos agregados destas com as plaquetas (WIENKAMP, ERPENBECK; ROSSAINT, 2022). Entretanto, no presente estudo a mediana das plaquetas para ambos os grupos se apresentou dentro do valor de referência, com o grupo de óbito com menores níveis de plaquetas que o grupo de alta. Os componentes de NETs ao interagirem com as plaquetas são capazes de ativar a coagulação. Altas quantidades de dímero D são descritas como produto dessa hipercoagulação e foram encontradas para os dois grupos aqui analisados (HUCKRIEDE *et al.*, 2021). Apesar disso, não foi encontrada correlação entre os marcadores de NETs, plaquetas e dímero D. As dosagens elevadas de PCR para ambos os grupos são descritas na COVID-19 grave, reflexo da exacerbada resposta inflamatória na qual as NETs contribuem. Sendo assim, foi encontrada correlação significativa entre cfDNA, MPO e PCR. Nesse sentido, sendo o cfDNA um DAMP, o aumento de cfDNA contribui para a inflamação por meio da ativação de TLRs (HUCKRIEDE *et al.*, 2021).

A presença de H3Cit durante a permanência na UTI foi associada ao aumento da incidência de eventos tromboembólicos e à presença de infecção secundária (HUCKRIEDE *et al.* 2021). Níveis circulatórios aumentados de marcadores de NETs foram associados à necessidade de suporte respiratório (NG *et al.*, 2021; BUHR *et al.*, 2022). Além disso, ensaio de imunocoloração para H3Cit e MPO utilizando tecido pulmonar de autópsia de pacientes com COVID-19 demonstrou abundante presença de NETs e neutrófilos geradores de NETs em locais de dano alveolar e coagulação intravascular (OBERMAYER *et al.*, 2021). Os efeitos deletérios de NETs também alcançam outros órgãos, comprometendo a microvasculatura do fígado, rim e coração (ACKERMANN *et al.*, 2021). Na COVID-19 grave o estímulo aumentado à liberação de NETs pelos neutrófilos é associado à hiperestimulação destas células que leva à produção de neutrófilos imaturos de baixa densidade por mielopoiese de emergência. É descrito que os neutrófilos de baixa densidade possuem maior capacidade de liberação de NETs (RAWAT; VRATI; BANERJEE, 2021).

Nas variáveis sociodemográficas e clínicas de sexo, idade e comorbidades, nossos resultados condizem com o descrito na literatura, em que nos casos mais graves de COVID-19 predominam o sexo masculino, a média de idade de 60 a 70 anos e hipertensão e diabetes como comorbidades frequentes (HUCKRIEDE *et al.*, 2021; PRÉVEL *et al.*, 2022). Analisando as dosagens de NETs de acordo com o sexo, não foi encontrada diferença significativa desta variável para os quatro marcadores dosados. Entretanto, no estudo de Buhr *et al.* (2022) foi relatada diminuição na degradação de NETs pela atividade insuficiente de DNase em homens, e maior risco de efeitos prejudiciais de NETs. Com relação à idade, apesar das comparações dos componentes de NETs em grupos de idades revelarem diferença significativa apenas para H3Cit, é relatado que o fato dos idosos serem mais vulneráveis à infecção por SARS-CoV-2 e a taxa de morbidade ser maior em pacientes mais velhos pode ter influência dos neutrófilos de idosos serem fenotípica e funcionalmente diferentes quando comparados à população mais jovem, sendo mais propensos à formação de NETs (RAWAT; VRATI; BANERJEE, 2021).

Diante da presença das NETs na patogênese da COVID-19, diferentes estratégias terapêuticas com alvo neste mecanismo são propostas e estudadas. Alguns destes fármacos atuam na degradação ou inibição dos próprios constituintes de NETs como a Dornase Alfa para o cfDNA (COVIDORNASE - NCT04355364, DORNASESARS2 - NCT04402970), os inibidores de elastase (Elafin - NCT03522935, Alvelestat - NCT04539795) e de mieloperoxidase. Outros compostos atuam no mecanismo de formação de NETs como os inibidores de PAD4 (GSK199), de Gasdermina D (Disulfiram) e dos microtúbulos (Colchicina). Outros, ainda, são propostos por ser papel anti-inflamatório e anti coagulante como o inibidor de IL-1 $\beta$  (Ankinara), glicocorticóides e heparina (ACKERMANN *et al.*, 2021; HIDALGO *et al.*, 2022; RAWAT; VRATI; BANERJEE, 2021). Na busca de alternativas naturais, foram encontrados resultados positivos na inibição de NETs pelo polifenol Resveratrol, o qual possui papel antiviral e antioxidante (ANDRADE *et al.*, 2022). Um dos desafios encontrados na busca terapêutica é a definição do equilíbrio entre a resposta protetora e patológica de NETs.

Este trabalho apresenta limitações, entre as quais, a ausência de grupos controles saudáveis e COVID-19 negativos admitidos em UTI para a melhor comparação das variáveis analisadas e a determinação do impacto das NETs na COVID-19. Além disso, a falta de padronização quanto a execução metodológica na avaliação das NETs ainda é um desafio.

Assim, os maiores níveis de marcadores de NETs em pacientes que foram a óbito e as correlações encontradas entre eles apontam para a contribuição desse mecanismo no agravamento da COVID-19 a um desfecho desfavorável. Essa contribuição pode ser explicada

pelo envolvimento dos componentes de NETs no dano epitelial e endotelial, na formação de trombos e na hiperinflamação.

## **8. CONCLUSÃO**

Dessa forma, marcadores de NETs como a mieloperoxidase, histona H3 citrulinada e DNA livre de células estão elevados em pacientes com COVID-19 que evoluem com pior prognóstico e estão correlacionados entre si e com outros marcadores, levando à necessidade de atingir esse alvo em estudos e como estratégia terapêutica para indivíduos infectados com a forma grave da doença, melhorando, assim, o seu prognóstico. Além disso, aspectos sociodemográficos e clínicos como a idade e presença de comorbidades; e laboratoriais como o NLR também influenciam na evolução para um desfecho desfavorável da COVID-19 grave.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PÍLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019.

ACKERMANN, M. *et al.* Patients with COVID-19: in the dark-NETs of neutrophils. **Cell Death and Differentiation**, v. 28, n. 11, p. 3125–3139, 2021.

ALANAGREH, L.; ALZOUGHLOO, F.; ATOUM, M. The Human Coronavirus Disease COVID-19: Its Origin, Characteristics, and Insights into Potential Drugs and Its Mechanisms. **Pathogens**, v. 9, n. 33, p. 1-11, 2020.

ANDRADE, M. M. S. *et al.* Resveratrol Downmodulates Neutrophil Extracellular Trap (NET) Generation by Neutrophils in Patients with Severe COVID-19. **Antioxidants**, v. 11, n. 9, 2022.

ARATANI, Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil functionArchives of Biochemistry and Biophysics. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 640, p. 47-52, 2018.

ASTUTI, I.; YSRAFIL. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, v. 14, n. 4, p. 407–412, 2020.

AZKUR, A. K. *et al.* Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 75, n. 7, p. 1564–1581, 2020.

BECKER, K. *et al.* Vasculitis and Neutrophil Extracellular Traps in Lungs of Golden Syrian Hamsters With SARS-CoV-2. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. 640842, 2021.

BOUADMA, L. *et al.* Immune Alterations in a Patient with SARS-CoV-2-Related Acute Respiratory Distress Syndrome. **Journal of Clinical Immunology**, v. 40, p. 1082-1092, 2020.

BRASIL, Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. Emergência de Saúde Pública de importância Nacional pela COVID-19. Versão 3, 15 março de 2021. Disponível em: <[https://www.conasems.org.br/wp-content/uploads/2021/03/Guia-de-vigila%CC%82ncia-epidemiolo%CC%81gica-da-covid\\_19\\_15.03\\_2021.pdf](https://www.conasems.org.br/wp-content/uploads/2021/03/Guia-de-vigila%CC%82ncia-epidemiolo%CC%81gica-da-covid_19_15.03_2021.pdf)>. Acesso em: jan. 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde. Painel Coronavírus. 2022. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br/>>. Acesso em: jan. 2022.

BRINKMANN, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-5, 2004.

BUHR, N. *et al.* Impaired Degradation of Neutrophil Extracellular Traps: A Possible Severity Factor of Elderly Male COVID-19 Patients. **Journal of Innate Immunity**, v. 14, n. 5, p. 461-476, 2022.

CÂMARA, F. P.; CÂMARA, D. C. P.; MORENO, M. Covid-19: trajetória atual e futura / Covid-19: current and future trajectory. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 5, p. 13377–13382, 2020.

CASTANHEIRA, F. V. S.; KUBES, P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. **Blood**, v. 133, n. 20, p. 2178-2185, 2019.

CAVALCANTE-SILVA, L. H. A. *et al.* Neutrophils and COVID-19: The road so far. **International Immunopharmacology**, v. 90, n. 107233, 2021.

CEARÁ, Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Boletim epidemiológico Covid-19 e outros vírus respiratórios N° 13. 2022. Disponível em: <[https://www.saude.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/9/2020/02/BOLETIM\\_COVID\\_N13\\_26.05.22.pdf](https://www.saude.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/9/2020/02/BOLETIM_COVID_N13_26.05.22.pdf)>. Acesso em jun. 2022.

CEARÁ, Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, IntegraSUS. Cenário Epidemiológico Covid-19. 2022. Disponível em: <<https://integrasus.saude.ce.gov.br/#/indicadores/indicadores-coronavirus/cenario-epidemiologico-covid-19>>. Acesso em jan. 2022.

CEARÁ, Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, IntegraSUS. Boletim Covid-19. 2022. Disponível em: <<https://integrasus.saude.ce.gov.br/#/indicadores/indicadores-coronavirus/coronavirus-ceara>>. Acesso em jun. 2022.

CHEN, Y. *et al.* IP-10 and MCP-1 as biomarkers associated with disease severity of COVID-19. **Molecular Medicine**, v. 26, n. 1, 2020.

CHUA, R. L. *et al.* COVID-19 severity correlates with airway epithelium–immune cell interactions identified by single-cell analysis. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 970–979, 2020.

CRUZ, K. A. T.; LIMA, P. S.; PEREIRA, A. L. A. Principais aspectos do novo coronavírus SARS-CoV-2: uma ampla revisão. **Arquivos do Mudi**, v. 25, n. 1, p. 73–90, 2021.

DARIA, S.; ISLAM, M.R. The SARS-CoV-2 omicron wave is indicating the end of the pandemic phase but the COVID-19 will continue. **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 6, p. 2343-2345, 2022.

DHAMA, K. *et al.* Coronavírus Disease 2019–COVID-19. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 4, p. 1–48, 2020.

DRAGONI, G.; DE HERTOGH, G.; VERMEIRE, S. The Role of Citrullination in Inflammatory Bowel Disease: A Neglected Player in Triggering Inflammation and Fibrosis. **Inflammatory Bowel Diseases**. v. 27, n. 1, p. 134-144, 2021.

FARA, A. *et al.* Cytokine storm and COVID-19: a chronicle of pro-inflammatory cytokines: Cytokine storm: The elements of rage! **Open Biology**, v. 10, n. 9, 2020.

FORTALEZA, Secretaria Municipal de Saúde de Fortaleza. Coordenadoria de Vigilância em Saúde - Célula de Vigilância Epidemiológica. Informe Semanal COVID-19. 10º semana epidemiológica, 2021. Disponível em: <[https://saude.fortaleza.ce.gov.br/images/coronavirus/PDFS/Informe-semanal-COVID-19-SE-10-2021-3\\_compressed.pdf](https://saude.fortaleza.ce.gov.br/images/coronavirus/PDFS/Informe-semanal-COVID-19-SE-10-2021-3_compressed.pdf)>. Acesso em: jan. 2022.

FRAGA-SILVA, T. F. C. *et al.* COVID-19: Integrating the Complexity of Systemic and Pulmonary Immunopathology to Identify Biomarkers for Different Outcomes. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 599736, 2021.

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

HAN, H. *et al.* Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. **Emerging Microbes and Infections**, v. 9, n. 1, p. 1123–1130, 2020.

HAN, D. S. C; LO, Y. M. D. The Nexus of cfDNA and Nuclease Biology. **Trends in Genetics**, v. 37, n. 8, p. 758-770, 2021.

HIDALGO, A. *et al.* Neutrophil extracellular traps: from physiology to pathology. **Cardiovascular Research**, v. 118, p. 2737-53, 2022.

HUCKRIEDE, J. *et al.* Histone H3 Cleavage in Severe COVID-19 ICU Patients. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. 694186, 2021.

JING, H. *et al.* Neutrophil extracellular traps (NETs): The role of inflammation and coagulation in COVID-19. **American Journal of Translational Research**, v. 13, n. 8, p. 8575-8588, 2021.

JOHNS HOPKINS UNIVERSITY. Coronavirus COVID-19 Global Cases by Johns Hopkins CSSE. Johns Hopkins University, 2020. Disponível em: <<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>>. Acesso em: jan. 2022.

JUNIOR, J. M. S. *et al.* Aplicabilidade do Escore Fisiológico Agudo Simplificado (SAPS 3) em Hospitais Brasileiros. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 60, n. 1, 2010.

KARGAPOLOVA, Y. *et al.* The enzymatic and non-enzymatic function of myeloperoxidase (MPO) in inflammatory communication. **Antioxidants**, v. 10, n. 562, 2021.

KINNARE, N. *et al.* Neutrophil Extracellular Trap Formation Potential Correlates with Lung Disease Severity in COVID-19 Patients. **Inflammation**, v. 45, n. 2, p. 800-811, 2022.

KORKMAZ, B. *et al.* Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. **Pharmacological Reviews**, v. 62, n. 4, p. 726–759, 2010.

LAI, C. K. C.; LAM, W. Laboratory testing for the diagnosis of COVID-19. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 538, p. 226–230, 2021.

LÁZARO, A. P. P. *et al.* Critically ill COVID-19 patients in northeast Brazil: mortality predictors during the first and second waves including SAPS 3. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 046, p. 1-9 , 2022.

LI, X. *et al.* Immune characteristics distinguish patients with severe disease associated with SARS-CoV-2. **Immunologic Research**, v. 68, n. 6, p. 398–404, 2020.

LIU, H. *et al.* Mechanisms of COVID-19 thrombosis in an inflammatory environment and new anticoagulant targets. **American Journal of Translational Research**, v. 13, n. 5, p. 3925-3941.

LIU, Q. Q. *et al.* Cytokines and their relationship with the severity and prognosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19): A retrospective cohort study. **British Medical Journal**, v. 10, n. 11, p. 1–10, 2020.

MAHASE, E. Coronavirus covid-19 has killed more people than SARS and MERS combined, despite lower case fatality rate. **British Medical Journal**, v. 368, n. 641, 2020.

MASTERS, P.S; PERLMAN, S. Coronaviridae. In: FIELDS, B.N. & KNIPE, D.M., editors-in-chief. CHANOCK, R.M.; HIRSCH, M.S.; MELNICK, J.L.; MONATH, T. P. & ROIZMAN, B., associate editors. **Fields Virology**. 6. ed. USA:Lippincott Williams & Wilkins, 2013. cap. 28, p. 825-854.

MASRE, S. F. *et al.* Classical and alternative receptors for SARS-CoV-2 therapeutic strategy. **Reviews in Medical Virology**, v. 31, n. 5, p.1-9, 2020.

MASUDA, S. *et al.* NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. **Clinica Chimica Acta**, v. 459, p. 89-93, 2016.

METZLER, K. D. *et al.* A Myeloperoxidase-Containing Complex Regulates Neutrophil Elastase Release and Actin Dynamics during NETosis. **Cell Reports**, v. 8, n. 3, p. 883-96, 2014.

MISTRY, P. *et al.* SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. 809244, 2022.

MONTICOLO, F. *et al.* The Role of DNA in the Extracellular Environment: A Focus on NETs, RETs and Biofilms. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. 589837, 2020.

MORIMONT, L. *et al.* NETosis and Nucleosome Biomarkers in Septic Shock and Critical COVID-19 Patients: An Observational Study. **Biomolecules**, v. 12, n. 8, 2022.

MORTEZAEI, K.; MAJIDPOOR, J. CD8<sup>+</sup> T Cells in SARS-CoV-2 Induced Disease and Cancer-Clinical Perspectives. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. 864298, 2022.

MURALIDHARAN, A.; WYATT, T. A.; REID, S. P. SARS-CoV-2 Dysregulates Neutrophil Degranulation and Reduces Lymphocyte Counts. **Biomedicines**, v. 10, n. 382, 2022.

NAGLER, M. *et al.* Extracellular DNA in natural environments: features, relevance and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 15, p. 6343–6356, 2018.

NAKAZAWA, D.; ISHIZU, A. Immunothrombosis in severe COVID-19. **EBioMedicine**, v. 59, n. 102942, 2020.

NASCIMENTO, C. R. *et al.* What cellular mechanisms are related to thromboembolic events in patients with covid-19? **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 20, 2021.

NG, H. *et al.* Circulating Markers of Neutrophil Extracellular Traps Are of Prognostic Value in Patients With COVID-19. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 41, n. 2, p. 988-994, 2021.

NIH. Clinical Spectrum of SARS-CoV-2 Infection. 2022. Disponível em: <<https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/overview/clinical-spectrum/>>. Acesso em: jan. 2022.

NOTZ, Q. *et al.* Pro- and Anti-Inflammatory Responses in Severe COVID-19-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome—An Observational Pilot Study. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1–13, 2020.

OBERMAYER, A. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps in Fatal COVID-19-Associated Lung Injury. **Disease Markers**, v. 2021, n. 5566826, 2021.

OMS. Coronavirus (COVID-19) Dashboard. 2022. Disponível em: <<https://covid19.who.int/>>. Acesso em: 10 jun. 2022.

PALACIOS CRUZ, M. *et al.* COVID-19, una emergencia de salud pública mundial. **Revista Clinica Espanola**, v. 221, n. 1, p. 55-61, 2021.

PALUDAN, S. R.; MOGENSEN, T. H. Innate immunological pathways in COVID-19 pathogenesis. **Science immunology**, v. 7, n. 67, 2022.

PIETRAMELLARA, G. *et al.* Extracellular DNA in soil and sediment: Fate and ecological relevance. **Biology and Fertility of Soils**, v. 45, p. 219-235, 2009.

PRÉVEL, R. *et al.* Plasma Markers of Neutrophil Extracellular Trap Are Linked to Survival but Not to Pulmonary Embolism in COVID-19-Related ARDS Patients. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. 851497, 2022.

RAI, P. *et al.* Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 2, p. 441-455, 2021.

RAVINDRAN, M.; KHAN, M. A.; PALANIYAR, N. Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology. **Biomolecules**, v. 9, n. 365, 2019.

RAWAT, S.; VRATI, S.; BANERJEE, A. Neutrophils at the crossroads of acute viral infections and severity. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 81, n. 100996, 2021.

RYDZYNSKA, Z. *et al.* Neutrophil Elastase Defects in Congenital Neutropenia. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. 653932, 2021.

SABBATINI, M.; MAGNELLI, V.; RENÒ, F. Netosis in wound healing: When enough is enough. **Cells**, v. 10, n. 3, p. 1–13, 2021.

SCHRIJVER, B. *et al.* Extensive longitudinal immune profiling reveals sustained innate immune activation in COVID-19 patients with unfavorable outcome. **European Cytokine Network**, v. 31, n. 4, p. 154–167, 2020.

SCHURINK, B. *et al.* Viral presence and immunopathology in patients with lethal COVID-19: a prospective autopsy cohort study. **The Lancet Microbe**, v. 1, n. 7, p. 290–299, 2020.

SHAH, V. K. *et al.* Overview of Immune Response During SARS-CoV-2 Infection: Lessons From the Past. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 1949, p. 1–17, 2020.

SILVA, C. M. S. *et al.* Gasdermin-D activation by SARS-CoV-2 triggers NET and mediate COVID-19 immunopathology. **Critical Care**, v. 26, n. 206, 2022.

SØRENSEN, O. E.; BORREGAARD, N. Neutrophil extracellular traps - The dark side of neutrophils. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 5, p. 1612-20, 2016.

STEGELMEIER, A. A. *et al.* Type I Interferon-Mediated Regulation of Antiviral Capabilities of Neutrophils. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, 2021.

TAN, C.; AZIZ, M.; WANG, P. The vitals of NETs. **Journal Leukocyte Biology**, v. 110, n.4, p. 797-808, 2021.

THIERRY, A. R.; ROCH, B. Neutrophil extracellular traps and by-products play a key role in covid-19: Pathogenesis, risk factors, and therapy. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 9, p. 1–22, 2020.

VOROBJEVA, N. V. Neutrophil Extracellular Traps: New Aspects. **Moscow University Biological Sciences Bulletin**, v. 75, n. 4, p. 173–188, 2020.

VOYNOW, J. A.; SHINBASHI, M. Neutrophil elastase and chronic lung disease. **Biomolecules**, v. 11, n. 1065, 2021.

WIENKAMP, A. K.; ERPENBECK L.; ROSSAINT, J. Platelets in the NETworks interweaving inflammation and thrombosis. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. 953129, 2022.

WU, Y. *et al.* Incubation Period of COVID-19 Caused by Unique SARS-CoV-2 Strains A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA Network Open**, v. 5, n. 8, 2022.

YANG, P. *et al.* Increased circulating level of interleukin-6 and CD8+T cell exhaustion are associated with progression of COVID-19. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 9, n. 161, p. 1-9, 2020.

YÜCE, M.; FILIZTEKIN, E.; ÖZKAYA, K. G. COVID-19 diagnosis —A review of current methods. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 172, n. 112752, 2021.

ZAWROTNIAK, M.; RAPALA-KOZIK, M. Neutrophil Extracellular Traps (NETs)-formation and implications. **Acta Biochimica Polonica**, v. 60, n. 3, p. 277-84, 2013.

ZHU, Y.; CHEN, X.; LIU, X. NETosis and Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19: Immunothrombosis and Beyond. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. 838011, 2022.

ZUO, Y. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19. **Journal of Clinical Investigation Insight**, v. 9, n. 6, 2020.

**APÊNDICE A – HEAT MAP QUANTIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES DE NETs**

	Óbito	Alta		Óbito	Alta		Óbito	Alta		Óbito	Alta
<b>MPO</b>	1133,33	78,14	<b>EN</b>	869,14	114,35	<b>H3Cit</b>	8,31	1,33	<b>cfDNA</b>	23,6	2,99
	343,77	194,06		448,47	298,25			0,1		5,46	2,37
	528,86	211,24		686,31	229,56		4,75	4,97		2,96	3,87
	417,53	147,09		564,69	207,32		11,93	3,53		4,89	1,5
	1490,5	267,94		1025,74	387,68		24,25	14,63		4,63	4,07
	58,78	156,02		91,53	306,12		2,12	1,04		3,1	1,65
	42,34	96,05		88,73	321,51		0,26	0,56		2,07	0,869
	169,71	27,66		352,39	148,33			0,31		1,68	2,35
	240,8	234,73		513,01	685,8		1,53	2,53		3,37	1,98
	154,83	153,48		158,86	442,02		0,23	0,26		4,62	2,6
	127,58	48,58		471,28	290,85		7,95	0,34		3,42	2,47
	50,49	21,87		124,28	126,83		2,99	0,61		2,78	2,36
	49,53	69,45		164,78	217,33		0,74	0,16		2,81	1,98
	54,33	504,95		169,09	930,97			3,94		1,85	2,7
	238,63	116,61		332,21	220,75		1,6	1,53		4,35	2,36
	296,63	47,83		757,13	102,65		0,1	0,91		5,81	1,46
	72,42	766,41		245,16	843,49		2,77	6,6		3,43	4,23
	70,44	116,61		267,75	271,28		0,79	0,03		3,75	2,51
	275,6	107,62		394,23	206,47		1,16	2,02		3,1	1,49
	266,17	90,2		394,23	135,33		3,19	2,73		2,23	1,9
290,32	258,51	310,63	477,55	29,51	6,55	3,41	2,63				
181,59	891,52	256,74	914,12	9,76	4,54	2,71	2,82				
945,61	44,78	901,04	66,53	1,26	0,23	6,07	1,44				
435,63	115,41	696,29	218,4	3,96		2,48	1,42				

	151,85	214,2	109,92	557,51	3,69	0,16	2,2	2,6
	140,52	110,02	299,37	151,76			2,96	4,6
	181	65,45	354,93	151,96	0,44		2,09	1,9
	92,6	289,73	354,7	991,56		0,69	2,11	2,36
	114,82	78,14	126,64	163,14	7,03	1,09	2,57	3,47
	101,62	202,95	186,07	313,57	1,33	1,21	1,22	2,59
	537,58	113,02	729,96	114,93	7,76	1,26	4,28	2,48
	455,47	111,22	926,42	183,98	0,08	0,28	2,86	2,57
	209,46	157,22	412,35	195,91	1,99	3,98	3,8	2,25
	133,96	297,38	319,46	602,57		0,36	1,95	2,93
	340,84	417,53	335,41	770,38	3,4	0,51	6,58	2,85
	881,73	164,95	785,23	325,15	9,54	1,43	2,73	2,29
	157,81	116,01	279,71	350,55	4,92	0,39	2,07	1,93
	213,02	264,99	201,18	495,23	2,19	0,86	3,8	2,76
	191,68		255,87		0,23		1,95	
	544,56		476,59		2,17		2,32	
<b>Controles Neg</b>	<b>27,93</b>		<b>914,92</b>		<b>0,22</b>		<b>1,92</b>	

## ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

UFC - UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ /



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo dos mecanismos imunorreguladores em Covid-19: Possíveis ferramentas para o controle da doença

**Pesquisador:** JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 36139220.6.0000.5054

**Instituição Proponente:** Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.346.280

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo prospectivo no qual serão incluídos pacientes (> 18 anos) que entraram em contato com o SARS-CoV-2, assintomáticos (N=120) ou com a doença nas formas clínicas leve (N=120) e grave da doença (N=120), cuja carga viral ou presença de anticorpos IgM/IgG anti-SARS-CoV-2 será confirmada. Os pacientes serão recrutados em unidades de Saúde (hospitais e UPAs) integrantes da rede SUS Sistema Único de Saúde. Este projeto será submetido ao CEP - Comitê de Ética em Pesquisa - da Universidade Federal do Ceará / PROPESQ-UFC e aos CEPs das instituições coparticipantes envolvidas no estudo, por meio da Plataforma Brasil. O grupo controle (N=120) será composto por indivíduos que não foram confirmadamente expostos ao SARS-CoV-2. Todos os participantes do estudo receberão orientações sobre os objetivos, procedimentos e riscos associados à participação durante o procedimento de assinatura do termo de consentimento (TCLE), sendo assegurado o direito de voluntariedade com relação à participação. Um questionário do tipo semi-estruturado será aplicado a todos participantes no momento da inclusão no estudo. Avaliação clínica e laboratorial: Os pacientes incluídos no estudo terão seus prontuários avaliados constantemente para acompanhar a evolução clínica da infecção e para acessos de exames laboratoriais, de imagem e demais dados clínicos relevantes relacionados a sinais e sintomas do paciente em estudo, sendo que a carga viral e a detecção de anticorpos pode ser repetida conforme necessidade do estudo. Imunofenotipagem e quantificação da frequência de células T CD4, T CD8 e T reguladoras no sangue periférico: As análises de imunofenotipagem celular serão

**Endereço:** Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

**Bairro:** Rodolfo Teófilo

**CEP:** 60.430-275

**UF:** CE **Município:** FORTALEZA

**Telefone:** (85)3366-8344

**E-mail:** comepe@ufc.br

UFC - UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 4.346.280

realizadas nos períodos D0 (momento que o paciente procurou atendimento médico/ período de até 7 dias do início dos sintomas), D07 e D15. Para isso, as seguintes subpopulações celulares serão analisadas pela técnica de citometria de fluxo: CD3+ (linfócitos T totais), CD3+CD4+ (linfócitos T helper ou auxiliares), CD3+CD8+ (linfócitos T citotóxicos), CD4+CD25+GITR+, CD4+CD25+CTLA-4+, CD4+CD25+Foxp3+ (células T reguladoras). Controles isotípicos (IgG1-FITC, IgG2a-PE, IgG1-PercP) serão utilizados. Isolamento das células: mononucleares periféricas e avaliação da produção de citocinas intracelulares. Células mononucleares serão separadas por centrifugação em gradiente de densidade a partir de amostras de sangue periférico coletas. A produção de citocinas por linfócitos T CD4 ou CD8 será analisada por marcação intracelular após estimulação in vitro com PMA+ionomicina+brefeldina. Em seguida, as células serão resuspensas em solução permeabilizante e incubadas por 10 min a TA. Após lavagem, as células serão incubadas simultaneamente com anticorpos anti-citocina (IL-2, IL-4, IL-17, IFN- ou IL-10) e anticorpos contra marcadores de superfície (CD3, CD4, CD8) diretamente conjugados a fluorocromos por 30 min a 4C. Após lavagem, as células serão analisadas no citômetro de fluxo. Quantificação de citocinas no soro: As citocinas séricas serão quantificadas por meio da plataforma Multiplex (tecnologia Luminex®) nos períodos D0, D07 e D15. Será utilizado um painel de citocinas dos perfis de células Th1, Th2, Th17 e Treg. Para aqueles analitos que não estiverem disponíveis na plataforma de Multiplex, a quantificação será feita utilizando o ensaio de ELISA. Análises de polimorfismo genético: O DNA genômico será extraído das amostras de sangue total dos indivíduos. A extração de DNA será realizada usando o kit comercial, Biopur Extraction Kit Mini Plus Spin – 250 . Após a extração, será realizada a quantificação do DNA para verificação da concentração e pureza e em seguida as amostras serão corridas em gel de agarose a 0,8%, coradas com o agente intercalante GelRed® Nucleic Acid Gel Stain. A reação de RT-qPCR será realizada utilizando ensaios validados SNP TaqMan® Genotyping Assays (Applied Biosystems), para as variantes genéticas estudadas.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Caracterizar o perfil de linfócitos T efetores e citocinas séricas envolvidas na resposta imune de pacientes acometidos por SARS-CoV-2 apresentando as formas assintomática, leve e grave da doença, bem como polimorfismos genéticos de moléculas imunorreguladoras, para definição de possíveis marcadores de prognóstico e alvos terapêuticos. Objetivo Secundário: Avaliar em pacientes com diferentes manifestações clínicas da doença (assintomáticos, forma leve e formas graves) e nos indivíduos controles: Parâmetros clínicos e laboratoriais; - Determinação da

**Endereço:** Rua Cel. Nunes de Melo, 1000  
**Bairro:** Rodolfo Teófilo  
**UF:** CE **Município:** FORTALEZA **CEP:** 60.430-275  
**Telefone:** (85)3366-8344 **E-mail:** comepe@ufc.br

UFC - UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 4.346.280

carga viral ou soropositividade (IgG anti-SARS-CoV-2; - Frequência da população de células T CD4 efetoras (Th1, Th2 e Th17) no sangue periférico;- Frequência da população de células T CD8 efetoras no sangue periférico; - Frequência da população de células T reguladoras (Tregs) no sangue periférico; - Quantificação de citocinas nas diferentes subpopulações de linfócitos T efetores (citocina intracelular); - Perfil de citocinas próinflamatórias no soro; - Perfil de citocinas anti-inflamatórias no soro; - Correlacionar os parâmetros clínicos e laboratoriais com os parâmetros imunológicos;- Analisar a presença de SNPs em genes de moléculas envolvidas na resposta imune; Comparar os resultados observados nos diferentes grupos de pacientes que podem ser considerados prognósticos de melhora ou piora clínica.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos: Os riscos são mínimos para os participantes da pesquisa. Os riscos associados com a coleta de sangue incluem: dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecções no local de punção podem ocorrer. Cuidados serão tomados para minimizar esses riscos. O indivíduo poderá experimentar efeitos colaterais que não são conhecidos até o momento ou não foram relatados. Em caso de aparecimento de qualquer complicação, o indivíduo será assistido prontamente por equipe médica dos serviços de saúde participantes da pesquisa.

Benefícios: Os resultados do presente estudo não beneficiarão os indivíduos incluídos na pesquisa diretamente, mas serão fontes de conhecimento que poderão ser utilizados futuramente para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da Covid-19.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa relevante, sobre temática atual.

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

Todos os termos foram apresentados.

**Recomendações:**

Sem pendências

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

Todas as solicitações foram atendidas.

Sem pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Ao final da pesquisa, o relatório final deverá ser enviado a este CEP.

**Endereço:** Rua Col. Nunes de Melo, 1000  
**Bairro:** Rodolfo Teófilo **CEP:** 60.430-275  
**UF:** CE **Município:** FORTALEZA  
**Telefone:** (85)3366-8344 **E-mail:** comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 4.346.280

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1579446.pdf	14/09/2020 09:26:58		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_2.pdf	14/09/2020 09:23:56	JULIANA NAVARRO UEDA YAOKHITE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_covid.pdf	14/09/2020 09:23:07	JULIANA NAVARRO UEDA YAOKHITE	Aceito
Brochura Pesquisa	Brochura.pdf	14/09/2020 09:22:33	JULIANA NAVARRO UEDA YAOKHITE	Aceito
Folha de Rosto	rosto.pdf	05/08/2020 07:45:10	JULIANA NAVARRO UEDA YAOKHITE	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DACT.pdf	05/08/2020 07:43:18	JULIANA NAVARRO UEDA YAOKHITE	Aceito
Declaração de Pesquisadores	participantes.pdf	05/08/2020 07:34:01	JULIANA NAVARRO UEDA YAOKHITE	Aceito
Outros	questionario_covid.pdf	10/07/2020 16:54:57	JULIANA NAVARRO UEDA YAOKHITE	Aceito
Outros	carta_propesq.pdf	10/07/2020 16:54:38	JULIANA NAVARRO UEDA YAOKHITE	Aceito
Orçamento	orcamento_covid.pdf	10/07/2020 16:52:24	JULIANA NAVARRO UEDA YAOKHITE	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_covid.pdf	10/07/2020 16:51:49	JULIANA NAVARRO UEDA YAOKHITE	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

FORTALEZA, 19 de Outubro de 2020

Assinado por:  
**FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

**Bairro:** Rodolfo Teófilo

**CEP:** 60.430-275

**UF:** CE **Município:** FORTALEZA

**Telefone:** (85)3366-8344

**E-mail:** comepe@ufc.br

## ANEXO B – PARECER DA COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS, COMPLICAÇÕES, FATORES PROGNÓSTICOS E TRATAMENTO DE PACIENTES INTERNADOS DEVIDO À INFECÇÃO POR CORONAVÍRUS EM SALVADOR E FORTALEZA

**Pesquisador:** Geraldo Bezerra da Silva Junior

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 30579020.4.1001.0008

**Instituição Proponente:** Instituto Dr. José Frota - IJF/ Prefeitura de Fortaleza

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.026.888

#### Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações. As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1536050.pdf de 07/05/2020).

#### INTRODUÇÃO

O coronavírus é responsável por infecções em humanos desde os anos 1960, tendo sido identificadas novos grupos de vírus responsáveis por epidemias na história recente da humanidade, como a que ocorreu no início do século XXI na China, causando a síndrome respiratória aguda (SARS), e no Oriente Médio, causando a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS), gerando grande preocupação desde então, devido o grande potencial de disseminação para outros países (KUSCHNAROFF et al., 2015; ). A origem do coronavírus causador das epidemias em humanos de acordo com as evidências científicas é de reservatórios animais, havendo detecção de sua presença em morcegos e a possibilidade de sua reemergência causando grandes epidemias (MENACHERY et al., 2015; DE WIT et al., 2016). Mais recentemente, em dezembro de 2019, surgiu um novo grupo de coronavírus, na China, na província de Wuhan (ZHU et al., 2020), com uma

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-040

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.026.888

característica de maior infectividade, chamado de "novo coronavírus" (COVID-19) ocasionando uma grande epidemia neste país asiático, que logo se disseminou pela Europa e em seguida para as Américas, atingindo principalmente Estados Unidos, Canadá e Brasil até o início de abril de 2020, caracterizando uma pandemia de grande preocupação para a saúde pública mundial (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). No início do mês de abril de 2020 havia no mundo mais de 800 mil casos confirmados de infecção por COVID-19 e mais de 42 mil óbitos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). No Brasil, mais de 6000 casos e 200 óbitos, sendo a região nordeste a segunda com o maior número de casos e o Estado do Ceará o terceiro com o maior número de casos do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). A via de transmissão principal é o contato com indivíduos infectados, através de gotículas respiratórias (KUSCHNAROFF et al., 2015), sendo a principal faixa etária acometida a de pessoas entre 30 e 65 anos, e a maioria dos casos graves ocorrendo em idosos ou pessoas com comorbidades (YI et al., 2020). As principais manifestações clínicas são febre alta (>38°C), tosse seca, dispneia e mialgia (KUSCHNAROFF et al., 2015). Outros sintomas, menos frequentes, incluem dor de garganta, mal-estar, rinorreia, diarreia, náuseas e vômitos (YI et al., 2020). As formas graves evoluem com insuficiência respiratória, necessitando de terapia intensiva (KUSCHNAROFF et al., 2015). As alterações laboratoriais principais incluem leucopenia, linfopenia, plaquetopenia e elevação de enzimas hepáticas (KUSCHNAROFF et al., 2015). Outros marcadores estão elevados na infecção por COVID-19, como proteína C-reativa (PCR), VHS e d-dímero, mas o papel dos mesmos no diagnóstico e prognóstico ainda não está bem estabelecido (YI et al., 2020). A mortalidade do COVID-19, em torno de 2-3%, é menor que a observada nas outras epidemias causadas por este vírus, na China e no Oriente Médio, no início deste século, porém vem atingindo grandes proporções, possivelmente pela grande infectividade e pela grande mobilidade das pessoas no mundo todo. Medidas de isolamento vem sendo adotadas em vários países com o intuito de frear o crescimento exponencial da epidemia e, assim, reduzir o número de casos fatais, ao mesmo tempo em que se possibilita o desenvolvimento de terapia específica contra o vírus (até então inexistente) e de uma vacina, que também não existe. Desde a ocorrência das epidemias na China e no Oriente Médio (SARS/MERS), estudos vêm sendo realizados para o desenvolvimento de vacinas contra o coronavírus (LEE et al., 2016; EJUANES et al., 2016; NEMOTO et al., 2017; EYAL et al., 2020). O tratamento de suporte é a base principal da terapia desta infecção, apesar de uma variedade de medicamentos já ter sido testada para o COVID-19 (YI et al., 2020). Uma das medicações que parece ter o efeito mais benéfico é a cloroquina. Durante a pandemia do COVID-19 vários estudos vêm sendo realizado para testar a eficácia da cloroquina em pacientes internados por COVID-19, incluindo estudos multicêntricos e

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-040

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.026.888

ensaios clínicos (CORTEGIANI et al., 2020; COLSON et al., 2020), devido ao seu conhecido efeito anti-viral (COLSON et al., 2020), assim como testes com alguns anti-virais (WANG et al., 2020). A atual pandemia causada COVID-19 tem causado grande preocupação às autoridades no mundo todo, e várias complicações tem sido evidenciadas, incluindo lesão renal, que é frequente nas doenças tropicais (DAHER et al., 2019), o que está associado ao aumento da gravidade e da mortalidade. É necessário compreender melhor as manifestações clínicas e as complicações da infecção pelo COVID-19, determinar os possíveis fatores associados à mortalidade e qual o tratamento mais adequado, incluindo a investigação de possíveis tratamentos específicos. O objetivo principal deste projeto é investigar a infecção por COVID-19 em pacientes internados nas duas maiores áreas metropolitanas do nordeste do Brasil (Salvador e Fortaleza), em seus aspectos clínicos, laboratoriais, prognósticos e terapêuticos. Com isto espera-se contribuir para a elaboração e o aperfeiçoamento de protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas para a infecção por COVID-19, bem como fornecer subsídios para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da infecção por COVID-19, tendo por base a compreensão da fisiopatologia da doença.

### HIPÓTESE

Há fatores associados ao prognóstico e é necessário compreender melhor as manifestações clínicas e o tratamento da infecção pelo novo coronavírus (COVID-19).

### METODOLOGIA

Desenho do estudo: Trata-se de um estudo de coorte, prospectivo. População do estudo: Pacientes internados por coronavírus (COVID-19) no Hospital Instituto Dr. José Frota, em Fortaleza, Ceará, e no Hospital Português, em Salvador, Bahia, Brasil. Instrumento de pesquisa: Serão coletadas as informações necessárias para o preenchimento de um formulário de pesquisa semi-estruturado (anexo 1). Parâmetros Estudados: Características Clínicas: a) Dados sócio-demográficos: Idade, sexo, cor, profissão, escolaridade, naturalidade, procedência. b) História clínica – Tempo decorrido entre o primeiro sintoma e o diagnóstico (confirmação da infecção por COVID-19); tempo entre o início dos sintomas e o atendimento médico; presença de comorbidades (hipertensão, diabetes, doença renal prévia, neoplasia, doença hepática, entre outras). c) Exame físico: Pressão arterial, frequência cardíaca, frequência respiratória, peso, estatura, índice de massa corporal (IMC) e volume urinário de 24 horas. d) Manifestações clínicas: Sinais e sintomas (febre, tosse seca, dispneia, dor de garganta, mialgia, fraqueza, mal-estar, entre outros). Avaliação laboratorial – Laboratório de Nefrologia e Doenças Tropicais da Universidade

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-040

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.026.888

Federal do Ceará, Brasil: A avaliação laboratorial geral será feita de acordo com a rotina dos hospitais, não devendo onerar o sistema de saúde. Os exames de rotina, que serão avaliados são: hemograma completo, velocidade de hemossedimentação, proteína C-reativa (PCR), glicemia de jejum, ureia, creatinina (e taxa de filtração glomerular estimada), sódio, potássio, cloro, cálcio e magnésio plasmáticos, gasometria venosa, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatinoquinase (CK), bilirrubinas totais e frações, ácido úrico, proteínas totais, albumina, globulinas, fosfatase alcalina, tempo de ativação da protrombina (TAP), tempo de ativação parcial da tromboplastina (TTPA) e exame de urina tipo 1. A função renal será avaliada pelo método tradicional, por meio da dosagem de creatinina plasmática, sendo estimada a taxa de filtração glomerular pela fórmula CKDEPI ("Chronic Kidney Disease - Epidemiology") (LEVEY, 2009). A avaliação laboratorial dos novos biomarcadores será feita no Laboratório de Nefrologia e Doenças Tropicais da Universidade Federal do Ceará. Serão colhidos na admissão hospitalar e durante a internação (após 7 dias da admissão e no dia da alta hospitalar). Serão avaliados ainda os exames que forem realizados durante a internação e no momento da alta, para observar a evolução dos pacientes e o desfecho (recuperação da função renal ou desenvolvimento de doença renal crônica). Os novos biomarcadores serão quantificados por meio da técnica do imunoensaio ligado a enzima (ELISA) sanduíche, utilizando kit comercial fornecido pelos fabricantes. A técnica do ELISA sanduíche se baseia na quantificação do antígeno (o biomarcador) através de sua ligação com anticorpos específicos adsorvidos em placa de 96 poços (placa sensibilizada e fornecida no kit pelo fabricante). Serão seguidos os procedimentos de acordo com as normas do fabricante. Para a leitura colorimétrica será utilizado espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm. Os resultados das concentrações dos biomarcadores urinários serão normalizados pela creatinina urinária da mesma amostra e expressos em "mg/g-Creatinina".

### CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Serão selecionados os pacientes que tiverem diagnóstico confirmado de COVID-19, por RT-PCR, de acordo com as normas vigentes preconizadas pelo Ministério da Saúde (2020), no período de maio de 2020 a dezembro de 2021, e que obedeçam os seguintes critérios:

- (1) Pacientes com idade acima de 18 anos de idade,
- (2) Ambos os sexos, e
- (3) Assinatura do termo de consentimento livre após esclarecimentos pertinentes aos testes que serão realizados (TCLE).

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-040

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.026.888

**CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Serão excluídos os pacientes que tiverem os seguintes critérios:

- (1) Pacientes com sorologia inconclusiva para COVID-19,
- (2) Crianças,
- (3) Gestantes,
- (4) Portadores de Doença Renal Crônica em Diálise,
- (5) Transplantados renais ou pacientes transplantados de outros órgãos,
- (6) Pacientes em uso de imunossuppressores,
- (7) Pacientes em uso de Quimioterápicos.

**Objetivo da Pesquisa:**

**OBJETIVO PRIMÁRIO**

Investigar manifestações clínicas, complicações, fatores prognósticos e tratamento de pacientes internados devido à infecção por Coronavírus (COVID-19) em Salvador e Fortaleza.

**OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

- Traçar o perfil epidemiológico dos pacientes internados por COVID-19.
- Descrever as alterações laboratoriais encontradas nos pacientes internados por COVID-19.
- Investigar novos biomarcadores de lesão renal e inflamação nos pacientes internados por COVID-19 e avaliar se os mesmos têm relação com prognóstico.
- Determinar quais são os fatores de mau prognóstico na infecção por COVID-19. • Avaliar as possíveis complicações decorrentes da infecção por COVID-19 e quais os tratamentos mais adequados.
- Avaliar as medidas terapêuticas instituídas aos pacientes internados por COVID-19.
- Investigar a eficácia de tratamentos específicos direcionados à infecção por COVID-19, incluindo cloroquina e antivirais, prescritos de acordo com a indicação do médico assistente de cada paciente.
- Avaliar possíveis eventos adversos das medicações administradas no tratamento da infecção por COVID-19.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**RISCOS**

Os riscos desta pesquisa serão mínimos. Os pacientes serão submetidos a coletas de amostras de sangue e urina para a realização de exames laboratoriais, sendo o risco relacionado ao

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.719-040  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.026.888

procedimento, com risco mínimo de contaminação e acidentes de punção, uma vez que a coleta será feita em laboratório com pessoal especializado. A minimização dos riscos será feita com a coleta de exames laboratoriais por profissional experiente e qualificado, utilizando material estéril e descartável. A área a ser puncionada será limpa com o uso de algodão e álcool e medidas de hemostase para conter o sangramento serão empregadas. Há também riscos devido à exposição de dados pessoais dos pacientes durante a coleta das informações nos prontuários, porém estes riscos serão minimizados uma vez que os dados pessoais não serão coletados nem armazenados nos bancos de dados da pesquisa, uma vez que o objetivo é o conhecimento clínico de forma geral.

#### BENEFÍCIOS

O conhecimento das manifestações clínicas, das complicações, dos fatores associados ao prognóstico e do tratamento da infecção pelo novo coronavírus (COVID-19) é uma necessidade urgente do mundo contemporâneo, e este é um grande benefício do presente projeto de pesquisa. Este conhecimento propiciará um manejo mais adequado dos pacientes infectados pelo COVID-19, além de gerar um aprofundamento sobre esta doença. O diagnóstico precoce das complicações, incluindo lesão renal propiciará meios para a adoção de medidas de controle, prevenção e tratamento desta condição, evitando (ou pelo menos retardando) o desenvolvimento de insuficiência renal crônica. Os indivíduos que forem identificados como portadores de lesão renal serão encaminhados para acompanhamento com profissional especializado (Nefrologista) da Universidade de Fortaleza.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo de coorte, prospectivo.

População do estudo: Pacientes internados por coronavírus (COVID-19) no

Hospital Instituto Dr. José Frota, em Fortaleza, Ceará, e no Hospital Português, em Salvador, Bahia, Brasil.

Instrumento de pesquisa: Serão coletadas as informações necessárias para o preenchimento de um formulário de pesquisa semi-estruturado (anexo

1). Parâmetros Estudados:

Características Clínicas:

a) Dados sócio-demográficos: Idade, sexo, cor, profissão, escolaridade, naturalidade, procedência.

b) História clínica – Tempo decorrido entre o primeiro sintoma e o diagnóstico (confirmação da infecção por COVID-19); tempo entre o início dos sintomas e o atendimento médico; presença de comorbidades (hipertensão, diabetes, doença renal prévia, neoplasia, doença hepática, entre

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-040

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.026.888

outras).

c) Exame físico: Pressão arterial, frequência cardíaca, frequência respiratória, peso, estatura, índice de massa corporal (IMC) e volume urinário de 24 horas.

d) Manifestações clínicas: Sinais e sintomas (febre, tosse seca, dispneia, dor de garganta, mialgia, fraqueza, mal-estar, entre outros).

Avaliação laboratorial – Laboratório de Nefrologia e Doenças Tropicais da Universidade Federal do Ceará, Brasil:

A avaliação laboratorial geral será feita de acordo com a rotina dos hospitais, não devendo onerar o sistema de saúde. Os exames de rotina, que serão avaliados são: hemograma completo, velocidade de hemossedimentação, proteína C-reativa (PCR), glicemia de jejum, ureia, creatinina (e taxa de filtração glomerular estimada), sódio, potássio, cloro, cálcio e magnésio plasmáticos, gasometria venosa, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatinoquinase (CK), bilirrubinas totais e frações, ácido úrico, proteínas totais, albumina, globulinas, fosfatase alcalina, tempo de ativação da protrombina (TAP), tempo de ativação parcial da tromboplastina (TTPA) e exame de urina tipo 1. A função renal será avaliada pelo método tradicional, por meio da dosagem de creatinina plasmática, sendo estimada a taxa de filtração glomerular pela fórmula CKDEPI ("Chronic Kidney Disease - Epidemiology") (LEVEY, 2009).

A avaliação laboratorial dos novos biomarcadores será feita no Laboratório de Nefrologia e Doenças Tropicais da Universidade Federal do Ceará.

Serão colhidos na admissão hospitalar e durante a internação (após 7 dias da admissão e no dia da alta hospitalar). Serão avaliados ainda os exames que forem realizados durante a internação e no momento da alta, para observar a evolução dos pacientes e o desfecho (recuperação da função renal ou desenvolvimento de doença renal crônica). Os novos biomarcadores serão quantificados por meio da técnica do imunoenensaio ligado

a enzima (ELISA) sanduíche, utilizando kit comercial fornecido pelos fabricantes. A técnica do ELISA sanduíche se baseia na quantificação do antígeno (o biomarcador) através de sua ligação com anticorpos específicos adsorvidos em placa de 96 poços (placa sensibilizada e fornecida no kit pelo fabricante). Serão seguidos os procedimentos de acordo com as normas do fabricante. Para a leitura colorimétrica será utilizado espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm. Os resultados das concentrações dos biomarcadores urinários serão normalizados pela creatinina urinária da mesma amostra e expressos em "mg/g-Creatinina".

Tamanho da Amostra no Brasil: 1.000

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-040

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.026.888

Demais Centros Participantes no Brasil:

REAL SOCIEDADE PORTUGUESA 16 DE SETEMBRO - VALNÉLIA FRAGA DA SILVA

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

Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

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

Análise de respostas ao parecer pendente nº 3.983.441 emitido pela Conep em 22/04/2020:

1. Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido referente ao arquivo "TCLE.doc", postado na Plataforma Brasil em 06/04/2020:

1.1. Na página 1, lê-se: "(...) será disponibilizado parte do material coletado para a pesquisa de novos exames que poderão identificar marcadores de gravidade (novos biomarcadores), que podem ser utilizados no futuro como novos testes de laboratório (novos "exames")." As pesquisas, em qualquer área do conhecimento envolvendo seres humanos, deverão observar as seguintes exigências: utilizar o material biológico e os dados obtidos na pesquisa exclusivamente para a finalidade prevista no seu protocolo, ou conforme o consentimento do participante. Não é adequado realizar testes adicionais nas amostras biológicas sem que o participante da pesquisa tenha conhecimento e consentido com a sua realização. Sendo assim, solicita-se informar que somente os testes em amostras biológicas que estiverem descritos no TCLE serão realizados e quando autorizados pelo participante da pesquisa ao assiná-lo (Resolução CNS nº 466 de 2012, item III.2).

RESPOSTA: Realizamos a adequação do TCLE, excluindo a sentença que deixava dúvida sobre a possível realização de exames no futuro com as amostras biológicas coletadas dos participantes da pesquisa e detalhamos quais exames serão realizados no âmbito desta pesquisa.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.2. Na página 1 lê-se: "1. PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA: Ao participar desta pesquisa você irá realizar alguns exames laboratoriais[...]". O TCLE deve informar quais os exames que serão realizados no estudo. Solicitam-se adequações.

RESPOSTA: Detalhamos no TCLE quais exames serão realizados no âmbito desta pesquisa.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-040

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.026.888

1.3. No projeto, é informado que serão acessados dados demográficos, história clínica e manifestações clínicas dos participantes. Assim, se houver intenção de consultar o prontuário, essa informação deverá estar claramente expressa no TCLE. Isto visa garantir que o indivíduo receba as informações necessárias para a tomada de decisão autônoma acerca de sua participação ou não na pesquisa. Diante do exposto, solicita-se descrever no TCLE que é necessária a anuência do participante da pesquisa para o acesso e uso dos seus dados registrados no prontuário.

RESPOSTA: Providenciamos o termo de fiel depositário e incluímos a informação de que serão consultados dados dos prontuários.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.4. O TCLE não apresenta a numeração nas páginas. Com o objetivo de garantir a integridade do documento, solicita-se que sejam inseridos os números de cada página, bem com a quantidade total delas, como por exemplo: "1 de X" e assim sucessivamente até a página "X de X"

RESPOSTA: Incluímos no TCLE a numeração das páginas, bem como espaço para rubrica de todas as páginas.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.5. Solicita-se que conste no TCLE que todas as páginas deverão ser rubricadas pelo pesquisador responsável/pessoa por ele delegada e pelo participante/responsável legal (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.5.d).

RESPOSTA: Incluímos no TCLE a numeração das páginas, bem como espaço para rubrica de todas as páginas.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.6. O TCLE deve informar os meios de contato com o CEP (endereço, E-MAIL e TELEFONE nacional), assim como os horários de atendimento ao público. Também é necessário apresentar, em linguagem simples, uma breve explicação sobre o que é o CEP. Como o estudo envolve análise ética pela Conep, essas recomendações também devem ser estendidas a esta Comissão. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: Incluímos os meios de contato, tanto do pesquisador principal quanto do comitê de ética local, horários de contato e endereço.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.719-040

**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br



COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.026.888

1.7. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido não deve conter ressalva que negue a responsabilidade do pesquisador ou que implique ao participante da pesquisa abrir mão de seus direitos, incluindo o direito de buscar indenização por danos eventuais. Diante do exposto, solicita-se inserir no TCLE a explicitação acerca do direito de buscar indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.3.h).

RESPOSTA: Incluímos no TCLE as formas de ressarcimento e indenização.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.8. Solicita-se que o termo "paciente/sujeito" seja substituído pelo termo "participante da pesquisa" ao longo do texto do TCLE, conforme definição disposta no item II.10 da Resolução CNS nº 466 de 2012.

RESPOSTA: Adequamos o termo para "participante da pesquisa" em todo o TCLE.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

**Considerações Finais a critério da CONEP:**

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1536050.pdf	07/05/2020 08:43:56		Aceito
Outros	CartaResposta.pdf	07/05/2020 08:43:25	Geraldo Bezerra da Silva Junior	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.doc	22/04/2020 16:15:50	Geraldo Bezerra da Silva Junior	Aceito
Declaração de concordância	AnuencialJF2.pdf	22/04/2020 16:12:09	Geraldo Bezerra da Silva Junior	Aceito
Outros	FielDepositariolJF.pdf	22/04/2020 16:11:56	Geraldo Bezerra da Silva Junior	Aceito
TCLE / Termos de	TCLE_controle_alter.doc	22/04/2020	Geraldo Bezerra da	Aceito

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-040

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.026.888

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controle_alter.doc	16:10:51	Silva Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_sem_controle.doc	22/04/2020 16:10:41	Geraldo Bezerra da Silva Junior	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRostoDigitalizada.pdf	06/04/2020 13:41:53	Geraldo Bezerra da Silva Junior	Aceito
Outros	Questionario.doc	06/04/2020 11:37:03	Geraldo Bezerra da Silva Junior	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

BRASILIA, 16 de Maio de 2020

---

**Assinado por:**  
**Jorge Alves de Almeida Venancio**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-040

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

## ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

Rua Capitão Francisco Pedro, 1210 - Rodolfo Teófilo - CEP 60430-370

Fortaleza - CE Fone: (85) 3366 8262

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido/TCLE

---

Título do Estudo: "*Estudo dos mecanismos imunopatológicos e imunorreguladores em Covid-19: Possíveis ferramentas para o controle da doença*"

Pesquisadora Responsável: Profa. Dra. Juliana Navarro Ueda Yaochite

---

O (A) Senhor(a) está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa. Por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que o(a) senhor(a) não consiga entender, converse com o pesquisador responsável pelo estudo ou com um membro da equipe desta pesquisa para esclarecê-los.

A proposta deste termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) é explicar tudo sobre o estudo e solicitar a sua permissão para participar do mesmo.

OBSERVAÇÃO: Caso o indivíduo não tenha condições de ler e/ou compreender este TCLE, o mesmo poderá ser assinado e datado por um membro da família ou responsável legal pelo paciente.

---

#### **Objetivo do Estudo**

Neste estudo pretendemos investigar quais são as células e moléculas que participam da resposta imunológica durante as diferentes formas clínicas da Covid-19.

---

#### **Duração do Estudo**

A duração total do estudo é de 24 meses.

A sua participação no estudo será de aproximadamente 15 dias para o grupo de pacientes infectados pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2) ou terá participação pontual (1 único momento) para o grupo controle.

---

**Descrição do Estudo**

Participarão do estudo 480 indivíduos, divididos em quatro grupos: controles (não infectados pelo novo coronavírus/SARS-CoV-2, N=120); pacientes infectados pelo novo coronavírus assintomáticos (N=120); com sintomas leves da doença Covid-19 (N=120) e sintomas graves (N=120).

Este estudo será realizado na Universidade Federal do Ceará – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem.

O (a) Senhor(a) foi escolhido(a) a participar do estudo porque apresenta infecção pelo coronavírus SARS-CoV-2, e dependendo da ausência ou presença de sintomas será incluído nos diferentes grupos de estudo.

Para ser incluído no grupo controle, o(a) Senhor(a) não apresenta infecção pelo coronavírus SARS-CoV-2.

Grávidas e puérperas não poderão ser incluídas no estudo.

Não haverá remuneração financeira (pagamento) pela participação no estudo, sendo sua participação totalmente voluntária.

---

**Procedimento do Estudo**

Para os grupos de indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2: Após entender e concordar em participar, serão realizadas coletas de sangue em períodos de tempo determinados (total de 3 coletas, distribuídas em 15 dias – D0, D07 e D15) e acompanhamento médico. Assim, depois de aceitar participar do estudo, o Senhor(a) retornará aos serviços de saúde envolvidos no estudo, em dias agendados, para que sejam realizadas as coletas de sangue e acompanhamento por equipe médica.

Para os indivíduos do grupo controle: Após entender e concordar em participar, será realizada uma única coletas de sangue e aplicação de questionário por um membro integrante da pesquisa.

Realização dos procedimentos: coleta de sangue (volume de 10 mL) por punção periférica (utilizando uma agulha e seringa) da veia do antebraço e consulta com médico. Após esses procedimentos, o (a) Senhor(a) será liberado(a). Levaremos sua amostra de sangue para o laboratório de Imunologia, localizado na Faculdade de Farmácia da UFC (DACT/FFOE/UFC), para realização da separação dos

componentes do sangue (soro e células mononucleares), realização de exames laboratoriais e análises das células por citometria de fluxo.

Para todos os participantes, será aplicado um questionário do tipo semi-estruturado no momento da inclusão no estudo.

---

#### **Riscos Potenciais, Efeitos Colaterais e Desconforto para os participantes da pesquisa**

Os riscos são mínimos para os participantes da pesquisa. Os riscos associados com a coleta de sangue incluem: dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecções no local de punção podem ocorrer. Cuidados serão tomados para minimizar esses riscos. Você pode experimentar efeitos colaterais que não são conhecidos até o momento ou não foram relatados. Em caso de aparecimento de qualquer complicação, o indivíduo será assistido prontamente por equipe médica dos serviços de saúde envolvidos no estudo.

---

#### **Benefícios para o participante**

Os indivíduos serão acompanhados por equipe médica especializada, conferindo assim benefícios no acompanhamento da doença em questão e atenção direta ao paciente. Os resultados do presente estudo não beneficiarão os indivíduos incluídos na pesquisa diretamente, mas serão fontes de conhecimento que poderão ser utilizados futuramente para o desenvolvimento de novas terapias no futuro.

---

#### **Compensação financeira**

Você não receberá nenhuma compensação financeira (pagamento) para participar desta pesquisa e também não terá nenhuma despesa adicional.

---

#### **Participação Voluntária/Desistência do Estudo**

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, ou seja, você somente participa se quiser.

A não participação no estudo não implicará em nenhuma alteração no seu acompanhamento médico tão pouco alterará a relação da equipe médica com o mesmo. Após assinar o termo de consentimento, você terá total liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar de participar do estudo se assim o desejar, sem quaisquer prejuízos à continuidade do tratamento e acompanhamento na instituição.

**Novas Informações**

Quaisquer novas informações que possam afetar a sua segurança ou influenciar na sua decisão de continuar a participação no estudo serão fornecidas a você por escrito. Se você decidir continuar neste estudo, terá que assinar um novo (revisado) Termo de Consentimento Informado para documentar seu conhecimento sobre novas informações.

---

**Em Caso de Danos Relacionados à Pesquisa**

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

---

**Utilização de Registros Médicos e Confidencialidade**

Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do paciente a todo o momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, a menos que seja exigido por lei.

Os registros médicos que trazem a sua identificação e esse termo de consentimento assinado poderão ser inspecionados por agências reguladoras e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, contudo, sua identidade não será revelada nessas apresentações.

---

**Quem Devo Entrar em Contato em Caso de Dúvida**

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com a Pesquisadora principal Professora Juliana pelo telefone (85)9.8660-4608 ou com os comitês de ética:

- Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ. Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344/46. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira).

Os CEPs são as instâncias responsáveis pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas

as pesquisas envolvendo seres humanos.

---

**Declaração de Consentimento**

*Concordo em participar do estudo intitulado: "Estudo dos mecanismos imunopatológicos e imunorreguladores em Covid-19: Possíveis ferramentas para o controle da doença"*

*Li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis benefícios e riscos. Tive oportunidade de perguntar sobre o estudo e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Entendo que estou livre para decidir não participar desta pesquisa. Entendo que ao assinar este documento, não estou abdicando de nenhum de meus direitos legais.*

*Eu autorizo a utilização dos meus registros médicos (prontuários médico) pelo pesquisador, autoridades regulatórias e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Instituição.*

---

Nome do Participante de Pesquisa Letra de Forma

---

Data

---

Assinatura do Participante de Pesquisa

---

Nome da pessoa obtendo o Consentimento

---

Data

---

Assinatura da Pessoa Obtendo o Consentimento

---

Nome do Pesquisador Principal

---

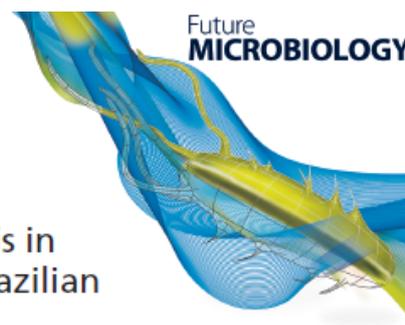
Data

---

Assinatura e Carimbo do Pesquisador Principal

## ANEXO D - ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA

Short Communication

For reprint orders, please contact: [reprints@futuremedicine.com](mailto:reprints@futuremedicine.com)

## Elevated IL-18 predicts poor prognosis in critically ill COVID-19 patients at a Brazilian hospital in 2020–21

Lucyana LC Coutinho<sup>1,1</sup>, Caroline N Oliveira<sup>1,1</sup>, Pollanna LMM Albuquerque<sup>2,3</sup>, Sandra MB Mota<sup>1,2</sup>, Gdayllon C Meneses<sup>1</sup>, Alice MC Martins<sup>4</sup>, Geraldo BS Junior<sup>2,3</sup>, Marco AF Clementino<sup>1</sup>, Raffaella NDG Gondim<sup>1</sup>, Alexandre Havt<sup>1</sup>, Luciano PG Cavalcanti<sup>1</sup> & Julliana NU Yachlte<sup>\*,4</sup>

<sup>1</sup>School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, 60430-160, Brazil

<sup>2</sup>Dr. José Frota Institute, Fortaleza, Ceará, 60025-061, Brazil

<sup>3</sup>University of Fortaleza, Fortaleza, Ceará, 60811-905, Brazil

<sup>4</sup>Faculty of Pharmacy, Dentistry & Nursing, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, 60430-370, Brazil

\*Author for correspondence: [ueda.julliana@gmail.com](mailto:ueda.julliana@gmail.com)

<sup>†</sup>Authors contributed equally

**Background:** A dysregulated inflammatory response contributes to decline in patients with COVID-19. This cross-sectional study evaluated biomarkers of unvaccinated patients admitted to the intensive care unit of a hospital in Fortaleza, Brazil. **Methods:** Twenty cytokines were quantified upon hospital admission; clinical and laboratory data were analyzed, as well as sociodemographic data, to search for an association with clinical outcomes, including fatal (n = 40) or recovered cases (n = 38). **Results:** Fatal cases exhibited significantly higher levels of IL-18 (p = 0.009); deceased patients were older (p = 0.0001), had a lower number of platelets (p = 0.0063) and higher neutrophil-lymphocyte ratio (p = 0.0230) than those who recovered. **Conclusion:** These findings indicate that IL-18 is a possible marker to predict poor prognosis in critically ill patients with COVID-19.

First draft submitted: 7 March 2022; Accepted for publication: 12 August 2022; Published online: 16 September 2022

**Keywords:** COVID-19 • IL-18 • immune response • inflammation • innate immunity