



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PATOLOGIA

LUCYANA LEÔNCIO CARRIJO COUTINHO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS EM
PACIENTES COM COVID-19 GRAVE**

FORTALEZA

2023

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS EM
PACIENTES COM COVID-19 GRAVE**

***EVALUATION OF THE PROFILE OF PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY
CYTOKINES IN PATIENTS WITH SEVERE COVID-19***

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

Orientador: Prof. Dr. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti
Coorientadora: Profa. Dra. Juliana Navarro Ueda Yachite

Fortaleza

2023

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)

L597a Leoncio Carrijo Coutinho, Lucyana.
Avaliação do perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias em pacientes com COVID-19 grave / Lucyana Leoncio Carrijo Coutinho. – 2023.
92 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti.

Coorientação: Profa. Dra. Juliana Navarro Ueda Yaochite.

1. COVID-19. 2. SARS-CoV-2. 3. SRAG. 4. Citocinas. 5. Sistema imune. I. Título.

CDD 571.9

LUCYANA LEÔNCIO CARRIJO COUTINHO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS EM
PACIENTES COM COVID-19 GRAVE**

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

Orientador: Prof. Dr. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti

Coorientadora: Profa. Dra. Juliana Navarro Ueda Yaochite

Aprovada em: 17/04/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Tércio Teodoro Braga
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Carlos Henrique
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por conceder saúde e proteção a mim e aos meus em todos os momentos.

Ao grande amor da minha vida, meu filho Miguel, agradeço simplesmente por existir e por ser tão compreensivo e carinhoso nas horas que precisei me ausentar ou estar um pouco mais distante da sua presença física. Obrigada, filho, pelos seus lanchinhos feitos com todo amor.

Ao meu marido, Bernardo, meu amor, maior incentivador e parceiro de vida, por toda companhia nas madrugadas, pelo carinho, cuidado e amor que você sempre faz questão de mostrar e falar. Obrigada por me ensinar tanto nesse momento acadêmico, por sempre apoiar minhas escolhas e acalmar meu coração.

À minha mãe, Ana Lúcia, por se fazer tão presente nesta fase e em tantas outras na minha vida. Todo seu amor, apoio e cuidado comigo e minha família fizeram toda a diferença na conclusão deste processo.

À minha irmã, Thatyana, que mesmo distante fisicamente se mantém presente emocionalmente. Obrigada por sempre se interessar pela minha vida, meu trabalho e minhas escolhas.

Ao meu pai, José Carlos, pelo interesse no meu trabalho e pelas orações de todos os dias.

Às minhas tias, Edna e Magda Carrijo, pelos ensinamentos de vida e pelas orações.

Ao meu orientador, Luciano Pamplona, pela paciência, orientação e a oportunidade de fazer parte de um grupo de trabalho forte e competente. Sou muito grata por me aceitar como aluna de mestrado, comprar minhas ideias e confiar no meu trabalho.

À minha querida coorientadora, Juliana Ueda, por ser um exemplo de pesquisadora, docente e ser humano. Obrigada pelas orientações, pelos ensinamentos e pela amizade. Grata por você ser uma peça fundamental nesse trabalho.

À minha colega de bancada, Carol Nobre, por todo apoio na bancada, nas escritas e nas trocas de experiências durante esse processo. Obrigada pela leveza, organização e tranquilidade que você sempre me transmitiu.

Aos meus amigos de vida e de trabalho, Héverton, Jéssica, Juliana, William e Elita, por todo apoio, carinho e amizade, fundamentais neste processo. As escutas de vocês me tranquilizaram e me deram forças. Obrigada pelos momentos de descontração, tão valiosos neste processo.

Às minhas amizades distantes fisicamente, principalmente Daniele e Valquíria, que me acompanham há tantos anos, presentes em tantas conquistas e nesta fase não seria diferente. Nossas vidas mudaram tanto, tivemos escolhas de vida diferentes, mas o carinho e a amizade continuam os mesmos.

Ao farmacêutico, Raphael, pela ajuda na bancada, pelos conhecimentos e experiências divididos durante todo o mestrado.

Ao Professor Alexandre Havt, pela parceria e apoio nos experimentos e por todo conhecimento acadêmico e técnico compartilhado. Pela disposição e dedicação do Dr. Marco Clementino e Raphaela, componentes do grupo de pesquisa do Prof Alexandre e do Prof. Aldo.

A todos os integrantes do grupo de pesquisa de COVID-19 multicêntrico e todos os órgãos de fomento público e privado.

A todos os meus colegas de mestrado do PPG em Patologia, pelas trocas de experiências, apoio e desabafos tão frequentes nos nossos grupos de mensagens. Sem vocês, a caminhada seria mais difícil.

"A Humanidade certamente necessita de homens práticos, que obtêm o máximo de seu trabalho e, sem esquecer o bem geral, resguardam seus próprios interesses. Contudo, a humanidade necessita também dos sonhadores, para quem o desenvolvimento desinteressado de um empreendimento é tão cativante que lhes torna impossível cuidar dos seus próprios interesses materiais."

Marie Curie

RESUMO

A COVID-19 é uma doença infecciosa respiratória aguda com potencial inflamatório multissistêmico. A desregulação nas respostas imune inata e adquirida promove uma tempestade de citocinas, responsável por induzir um processo de hiperinflamação que é uma das principais causas de óbito, especialmente em indivíduos idosos ou com comorbidades. Este estudo observacional transversal avaliou citocinas pró e anti-inflamatórias de pacientes não vacinados, que testaram positivo para infecção por SARS-CoV-2 e internados na UTI de um hospital em Fortaleza no período de 2020 a 2021. Amostras de soro foram coletadas na admissão hospitalar de 78 pacientes. O kit utilizado foi personalizado com 20 citocinas (GM-CSF, MCP-1, TNF- α , IFN- α e IFN- γ , IL-1 β , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-18, IL-2, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-9) denominado imunoensaio Multiplex ProcartaPlex Humano (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). A determinação das concentrações de cada biomarcador foi realizada no Sistema MAGPIX® baseado na tecnologia Luminex xMAP. Foram analisados dados clínicos e laboratoriais, assim como dados sociodemográficos, para buscar associação com os desfechos clínicos óbitos (n = 40) e recuperados (n = 38). A maior parte do grupo de óbitos foi composta por homens (70%). A mediana de idade para o n total foi de 59 anos (IQR=22-97), sendo que o grupo de óbitos apresentou uma mediana de 69,5 anos (IQR=22-97). Dentre as comorbidades, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) foi a mais frequente (30,7%). Nos dados laboratoriais observou-se uma diferença estatística entre os desfechos na contagem de plaquetas, com menor número delas no grupo de óbitos (p=0,0063). Das 20 citocinas quantificadas, apenas quatro apresentaram significância estatística. IL-18 e IL-22 apresentaram diferença para óbitos, com p=0,009 e p=0,473, respectivamente. Enquanto GM-CSF (Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos) e IL-23 tiveram diferença no grupo de altas, com p=0,0187 e p=0,313, respectivamente. Em todas as análises, foi considerado significância estatística com p < 0,05. A investigação das citocinas de forma precoce em conjunto com características clínicas e outros marcadores servem como preditores de bom ou mal prognóstico da COVID-19. Dessa forma, auxiliam nos tipos de alvos terapêuticos a serem utilizados para cada grupo fazendo com que desfechos fatais possam ser reduzidos ou evitados.

Palavras-chave: COVID-19; SARS-COV2; SRAG; citocinas; resposta imune; desfechos

ABSTRACT

COVID-19 is an acute respiratory infectious disease with multisystem inflammatory potential. The dysregulation in innate and acquired immune responses promotes a cytokine storm, responsible for inducing a hyperinflammation process that is one of the main causes of death, especially in elderly individuals or those with comorbidities. This cross-sectional observational study evaluated pro- and anti-inflammatory cytokines in unvaccinated patients who tested positive for SARS-CoV-2 infection and were admitted to the ICU of a hospital in Fortaleza from 2020 to 2021. Serum samples were collected on admission hospital of 78 patients. The kit used was customized with 20 cytokines (GM-CSF, MCP-1, TNF- α , IFN- α and IFN- γ , IL-1 β , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL -18, IL-2, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-4, IL-5, IL-6 and IL-9) called the Human ProcartaPlex Multiplex Immunoassay (Thermo Fisher Scientific, MA , USA). The concentration of the concentrations of each biomarker was performed on the MAGPIX® System based on Luminex xMAP technology. Clinical and laboratory data, as well as sociodemographic data, were analyzed to seek association with the clinical outcomes deaths (n = 40) and recovered (n = 38). Most of the group of deaths was made up of men (70%). The median age for the total was 59 years (IQR=22-97), and the group of deaths had a median of 69.5 years (IQR=22-97). Among the comorbidities, systemic arterial hypertension (SAH) was the most frequent (30.7%). In the laboratory data analyzed, there was a statistical difference between the results in the platelet count, with a smaller number in the group of deaths (p=0.0063). Of the 20 quantified cytokines, only four were statistically significant. IL-18 and IL-22 showed differences for deaths, with p=0.009 and p=0.473, respectively. While GM-CSF (granulocyte and macrophage colony stimulating factor) and IL-23 had a difference in the discharge group, with p=0.0187 and p=0.313, respectively. In all analyses, statistical significance was considered at $p < 0.05$. Early investigation of cytokines together with clinical characteristics and other markers serve as predictors of good or poor prognosis for COVID-19. In this way, they help in the types of therapeutic targets to be used for each group, so that fatal outcomes can be reduced or avoided.

Keywords: COVID-19; SARS-COV-2; SARS; cytokines; immune response, outcomes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. WHO Dashboard COVID-19 2020.....	17
Figura 2. Casos e óbitos confirmados de COVID-19 no Ceará.....	19
Figura 3. Origem dos Coronavírus.....	23
Figura 4. Esquema estrutural e genômica do SARS-CoV-2.....	24
Figura 5. Entrada e replicação viral e resposta imune.....	26
Figura 6. Tipos de testes para SARS-CoV-2.....	27
Figura 7. Tempo de intervalo estimado e taxa de detecção viral.....	29
Figura 8. Mecanismo Patogênico e ativação das células imunes.....	32
Figura 9. Fluxograma para seleção de amostras.....	37
Figura 10. Coloração e identificação das beads/Equipamento MGPIX.....	38
Gráfico 1. Comparação entre os grupos de homens e mulheres IL-18	42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Características sociodemográficas, clínicas e laboratoriais de pacientes com diagnóstico de COVID-19 grave internados na UTI do IJF..... 41
- Tabela 2** – Concentração de 20 citocinas analisadas nos desfechos óbitos e altas..... 43
- Tabela 3** – Correlação entre IL-18 e as variáveis idade, plaquetas, IL-22, IL-23 e GM-CSF..... 44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVC	Acidente Vascular Cerebral
ACE-2	<i>Angiotensin converting enzyme 2</i>
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
CoV s	Coronavírus
CS	Cytokine Storm
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
IFN	Interferon
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MERS-CoV	Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio
NSP	<i>Non-structural proteins</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
ORF	<i>Open Reading Frames</i>
POCT	Point- of-care testing
RNA	Ácido Ribonucleico
SARS-CoV	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SARS-CoV2	Coronavírus-2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
TMPRSS2	Transmembrane Serine Protease 2
TNF	Tumor Necrosis Factor
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	COVID-19	14
1.2	Epidemiologia	16
1.3	Coronavírus	21
1.4	SARS-COV-2	22
1.4.1	<i>Replicação viral</i>	25
1.4.2	<i>Diagnóstico laboratorial</i>	26
1.4.3	<i>Imunofisiopatologia</i>	29
1.4.4	<i>Tratamentos e vacinas</i>	32
2	Justificativa	34
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo Geral	35
3.2	Objetivos Específicos	35
4	MÉTODOS	35
4.1	Desenho do estudo/Seleção dos pacientes	35
4.2	Aspectos éticos	36
4.3	Critérios de inclusão e exclusão	36
4.4	Coleta e processamento	37
4.5	Quantificação dos marcadores biológicos	37
4.6	Análises estatísticas	39
5	Resultados	40
5.1	Dados Sociodemográficos,clínicos e laboratoriais	40
5.2	Citocinas	41
6	Discussão	45
7	Conclusão	52
8	Considerações Finais	53
	Referências	54
	Anexo A - Parecer do Comitê de ética e Pesquisa da UFC	62
	Anexo B – Parecer da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa	67
	Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	79
	Anexo D – Artigo Publicado em Revista Internacional	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 COVID-19

A COVID-19 é uma doença infecciosa respiratória aguda com potencial inflamatório multissistêmico. Os primeiros caso da doença ocorreram em Wuhan, China, em dezembro de 2019 através de um grupo de indivíduos que estiveram no Mercado Atacadista de Frutos do Mar de Huanan e foram internados com sintomas graves de pneumonia (HUANG *et al.*, 2020). Devido à gravidade da doença e sua alta taxa de propagação, em 31 de janeiro de 2020, a OMS a declarou como uma Emergência de Saúde Global e em 11 de março de 2020, como situação de pandemia (DHAMA *et al.*, 2020).

O agente causador da COVID-19, uma nova cepa de coronavírus, foi identificada nas amostras broncoalveolares de pacientes internados com pneumonia grave, em 07 janeiro de 2020 pelo Instituto de Virologia de Wuhan. O *SARS-CoV2*, como foi definida sua nomenclatura, apresenta 80% de semelhança na sequência de nucleotídeos com o coronavírus *SARS-COV* e 96% de semelhança com o coronavírus de morcegos. Cinco dias após sua identificação, o genoma completo foi mundialmente compartilhado (ZHOU *et al.*, 2020).

Os sintomas mais comuns são febre persistente, tosse seca e fadiga, mas outros menos comuns podem ocorrer como a perda do paladar ou olfato, congestão nasal, conjuntivite, dor de garganta, dor de cabeça, dores nos músculos ou articulações, diferentes tipos de erupção cutânea, náusea ou vômito, diarreia, calafrios ou/e tonturas (WHO, 2021). Em seu estudo, Guan *et al.* (2020), mostraram que 48,3% dos pacientes apresentaram febre durante a admissão hospitalar e 88,7% durante a hospitalização, seguido de tosse em 67,8% dos internados.

A infecção pelo *SARS-CoV2* pode variar de casos assintomáticos ou com manifestações clínicas leves, moderadas, graves e críticas, sempre observando os sinais e sintomas que possam exigir uma hospitalização do indivíduo. Os assintomáticos são caracterizados com teste laboratorial positivo para COVID-19, mas sem manifestações de sintomas. As manifestações leves apresentam sintomas como febre, tosse, dor de garganta, coriza, com ou sem anosmia, ageusia, diarreia, dor abdominal e cefaleia. Os casos moderados, iniciam com sintomas clínicos leves, como tosse e febre, mas estes se tornam persistentes e com sinais de piora progressiva (dinamia, prostração, hiporexia) por mais de 5 dias, além de apresentarem pneumonia sem sintomas graves. Considera-se a presença de SRAG quando há dispneia ou pressão persistente no tórax e saturação de oxigênio menor que 95%. Já os casos críticos caracterizam-se por quadros que levam à necessidade de suporte respiratório em

Unidades de Terapia Intensiva (UTI) devido a complicações pela SRAG, como pneumonia grave, sepse e disfunção de múltiplos órgãos (BRASIL, 2021).

Por apresentar semelhança genética com o SARS-CoV, a principal forma de transmissão do SARS-CoV2 ocorre por contato direto de uma pessoa infectada ou por contato indireto de superfícies contaminadas. Estudos mostram que indivíduos infectados podem transmitir o vírus por meio de gotículas grandes ($> 5\text{--}10\ \mu\text{m}$) e também por aerossol ($\leq 5\ \mu\text{m}$) expelidos durante a respiração, fala, tosse e espirro (ZHANG *et al.*, 2020; MORAWSKA *et al.*, 2020). Indivíduos infectados assintomáticos também podem transmitir o vírus da mesma forma que os sintomáticos, dificultando o controle da doença. O vírus se espalha mais facilmente em ambientes fechados ou com pouca ventilação.

A transmissão de pessoa para pessoa depende da infectividade dos casos que é baseada na carga viral. A carga viral é definida como a concentração de partículas virais no meio biológico de transmissão, relacionada diretamente ao curso e à duração da doença. Quanto mais alta a carga viral, maior o risco de uma pessoa infectada transmitir o vírus para outras pessoas (HE *et al.*, 2020). O pico é atingido entre 2 a 3 dias antes do início dos sintomas e aumenta de forma gradual. Em casos leves, a carga viral diminui acentuadamente ao longo de 7 dias de tal forma que do quarto ao sétimo dia de infecção sintomática, o paciente torna-se muito menos propenso a infectar outras pessoas (TO *et al.*, 2020). Em casos mais graves, a carga viral começa a declinar após a segunda semana do início dos sintomas. Entretanto, a excreção viral prolongada foi relatada até 63 dias em swabs nasofaríngeos de pacientes adultos (LIU *et al.*, 2020). Um estudo recente mostrou que uma carga viral mais alta não significa maior risco de morte e que o óbito, como consequência da infecção viral, não encurta o período infeccioso (KUN *et al.*, 2023).

Recentemente, estudos mostraram que o vírus pode estar presente em outros fluidos corporais, como na urina e também nas fezes. O RNA do *SARS-CoV-2* é ocasionalmente detectado na urina, mas os relatos em amostras fecais são mais frequentes. O material genético do vírus foi detectado nas fezes de alguns indivíduos assintomáticos e sintomáticos leves com pico de eliminação no período sintomático podendo persistir por várias semanas. Devido à concentração do material genético do vírus na urina e nas fezes ser muito menor do que nos fluidos nasofaríngeos, a preocupação com essa forma de transmissão é bem menor (JONES *et al.*, 2020). Os riscos podem ser maiores em países menos desenvolvidos economicamente e com áreas de saneamento precário. No entanto, não há evidências suficientes que corroborem com esses achados, sendo necessário mais pesquisas nesta área.

O sistema imunológico do indivíduo é fator responsável pelo desenvolvimento dos

sintomas e o bom ou mau prognóstico da COVID-19. Casos graves e críticos, geralmente ocorrem em resposta imune não eficiente ou desregulada frente à infecção causada pelo *SARS-CoV-2*, que possui uma complexa patogenicidade. A desregulação nas respostas imune inata e adquirida, promove uma tempestade de citocinas, responsável por induzir um processo de hiperinflamação que é uma das principais causas de óbito, especialmente em indivíduos idosos ou com comorbidades (KRIZ; AHMAD, 2021). A tempestade de citocinas induz um influxo descontrolado de células para os pulmões, especialmente monócitos e neutrófilos, responsáveis por secretarem citocinas inflamatórias e quimiocinas. Todo esse processo leva a dano alveolar, edema pulmonar, formação de membrana hialina e descamação de pneumócitos que são definidos como os primeiros sinais de SRAG (BHARDWAJ *et al.*, 2021).

A COVID-19 está associada à morbidade e mortalidade significativa em todo o mundo, provavelmente tornando-se um dos maiores ônus sanitário e econômico dos últimos 100 anos. Tornou-se uma das principais lutas dos humanos nos tempos modernos, enfatizando a importância e a necessidade de uma estratégia global e de solidariedade entre nações. Como uma doença zoonótica que se espalhou globalmente, será praticamente impossível erradicar o seu agente etiológico (AZKUR *et al.*, 2020). Todo conhecimento sobre sua imunopatogênese é de extrema importância para definir biomarcadores específicos para cada fase da doença, estratégias terapêuticas eficazes e vacinas, como principal forma de proteção.

1.2. EPIDEMIOLOGIA

Nas últimas duas décadas, três surtos mundiais causados por coronavírus, provocaram uma preocupação na saúde pública global (GUARNER, 2020). A primeira ameaça imposta aos humanos pelos Coronavírus emergentes ocorreu em 2002 quando o *SARS-CoV* surgiu na província de Guangdong, China e se espalhou pelos cinco continentes, em 29 países, levando a 8.098 casos e uma taxa de mortalidade 9,6% até meados de setembro de 2003. Em 30 de janeiro, a OMS declarou o surto de *SARS-CoV* como uma Emergência Internacional de Saúde Pública. Em 2012, foi identificado o *MERS-CoV* na Península Arábica responsável por uma condição respiratória grave e de alta taxa de letalidade (35%). A Arábia Saudita foi o primeiro país a relatar casos de *MERS* e o principal local do surto da doença que tem, oficialmente, 2.279 casos confirmados com 806 mortes em 27 países (SOUZA *et al.*, 2021).

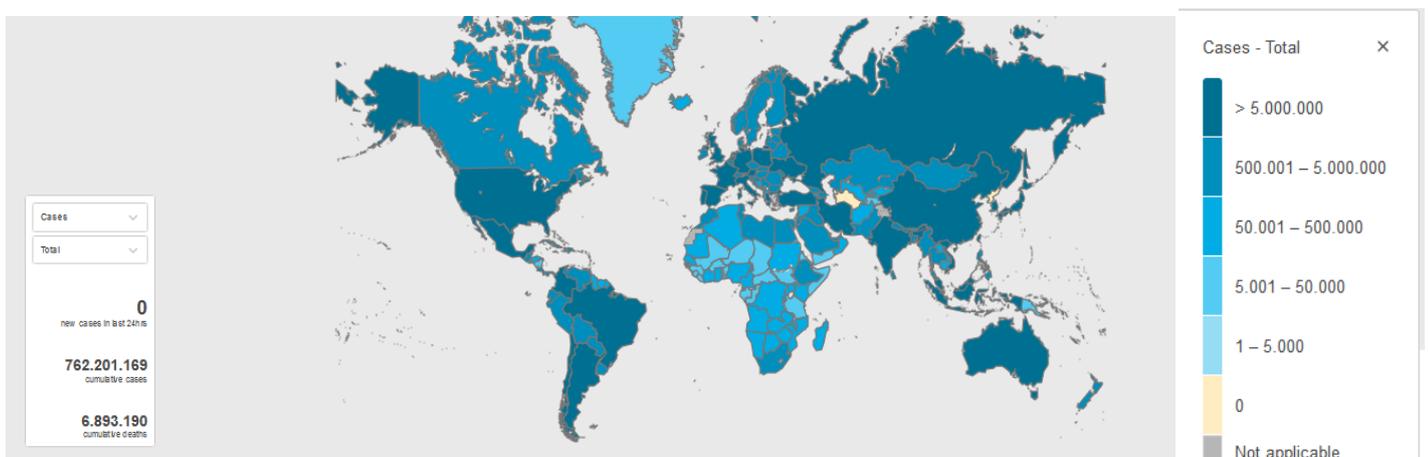
O primeiro grupo de pacientes apresentando sintomas de uma pneumonia de etiologia desconhecida ocorreu na cidade de Wuhan, província de Hubei, China central, em 12 de dezembro de 2019. A maioria dos casos estava relacionada com o Mercado Atacadista de

Frutos do Mar de Huanan, onde uma variedade de mamíferos estava disponível para venda, o que apontou para uma provável infecção de origem zoonótica, (KRIZ *et al.*, 2021). Em 01 de janeiro de 2020, após sete pacientes apresentarem sintomas graves e serem internados em UTI em estado crítico, o Mercado de Huanan foi fechado pelas autoridades chinesas (KANPS; HOFFMANN, 2020). Nestes primeiros casos, a transmissão de humano para humano foi especulada, mas não confirmada até que dois agrupamentos familiares, incluindo um em que o marido transmitiu a doença para sua esposa, foram identificados ainda no início de janeiro (KRIZ *et al.*, 2021).

Em 07 de janeiro de 2020, pesquisadores chineses identificaram o novo tipo de Coronavírus, o 2019-nCoV. Seu sequenciamento genético foi divulgado pela OMS em 12 de janeiro de 2020. Aproximadamente 10 dias depois, países como Tailândia, Japão, Nepal, França, Austrália, Coreia do Sul, Vietnã, Taiwan e Malásia reportaram seus primeiros casos. A partir de 20 de janeiro, autoridades chinesas reportaram 200 casos confirmados da infecção com 3 mortes e conseqüentemente, obrigaram o *lockdown* de dezenas de milhões de pessoas em seu território. Em fevereiro, de 2020, a OMS renomeou o vírus para *SARS-CoV-2* e a infecção causada por ele de COVID-19 (KANPS; HOFFMANN, 2020).

Em menos de 30 dias após os primeiros casos confirmados de COVID-19 na China, países vizinhos e até países da Europa e da América do norte notificaram seus primeiros casos. À medida que os casos começaram a aumentar exponencialmente, tornou-se evidente que o vírus estava se espalhando rapidamente através da transmissão de humano para humano (KRIZ *et al.*, 2021).

Figura 1. WHO COVID-19 Dashboard. Geneva: World Health Organization, 2020.



Fonte online: <https://covid19.who.int/> Acesso em: 06/04/2023.

O número total de casos de COVID-19 ultrapassaram 1 milhão em abril de 2020. O número de mortos chegou a 1 milhão em 25 de setembro de 2020. Até 22 de dezembro de 2020, todos os sete continentes tinham casos notificados de COVID-19. Em 4 de fevereiro de 2021, havia mais de 103 milhões de casos confirmados com mais de 2 milhões de mortes (TO *et al.*, 2021). Até 29 de setembro de 2022 foram contabilizados 613.942.561 casos com 6.520.263 mortes no mundo (OPAS *et al.*, 2022). Em 06 de abril de 2023, os números de casos confirmados no mundo foi de 762.201.169 com 6.893.190 óbitos (OMS, 2023) (Fig. 1).

O Brasil declarou uma emergência nacional de saúde pública por COVID-19 em 3 de fevereiro de 2020. Após o desenvolvimento de um plano de emergência nacional e o estabelecimento de instalações de diagnóstico molecular em toda a rede brasileira de laboratórios de saúde pública, o país relatou seu primeiro caso confirmado em 25 de fevereiro de 2020 (SOUZA *et al.*, 2020). O Brasil teve uma das epidemias de COVID-19 mais intensas no mundo, ocupando o 3º lugar de maior número de casos, com 34.646.577 e óbitos, 685.881 até 29 de setembro de 2022. Os Estados Unidos com 98.072.469 e a Índia com 44.675.095 ocupavam, respectivamente, o 1º e 2º lugar neste ranking (OPAS *et al.*, 2022).

Até 31 de maio de 2020, a maior parte dos casos confirmados e óbitos foram notificados nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Ceará e Amazonas, representando em conjunto, 49,2% de todos os casos e 61,5% das mortes no Brasil. Atualmente, a região Nordeste ocupa a terceira posição no número de casos confirmados de COVID-19 em relação à outras regiões do país, enquanto Sudeste e Sul ocupam o 1º e 2º lugar, respectivamente. O Ceará possui o 2º maior número de casos e óbitos no Nordeste, com a Bahia ocupando o 1º lugar (MS, 2022).

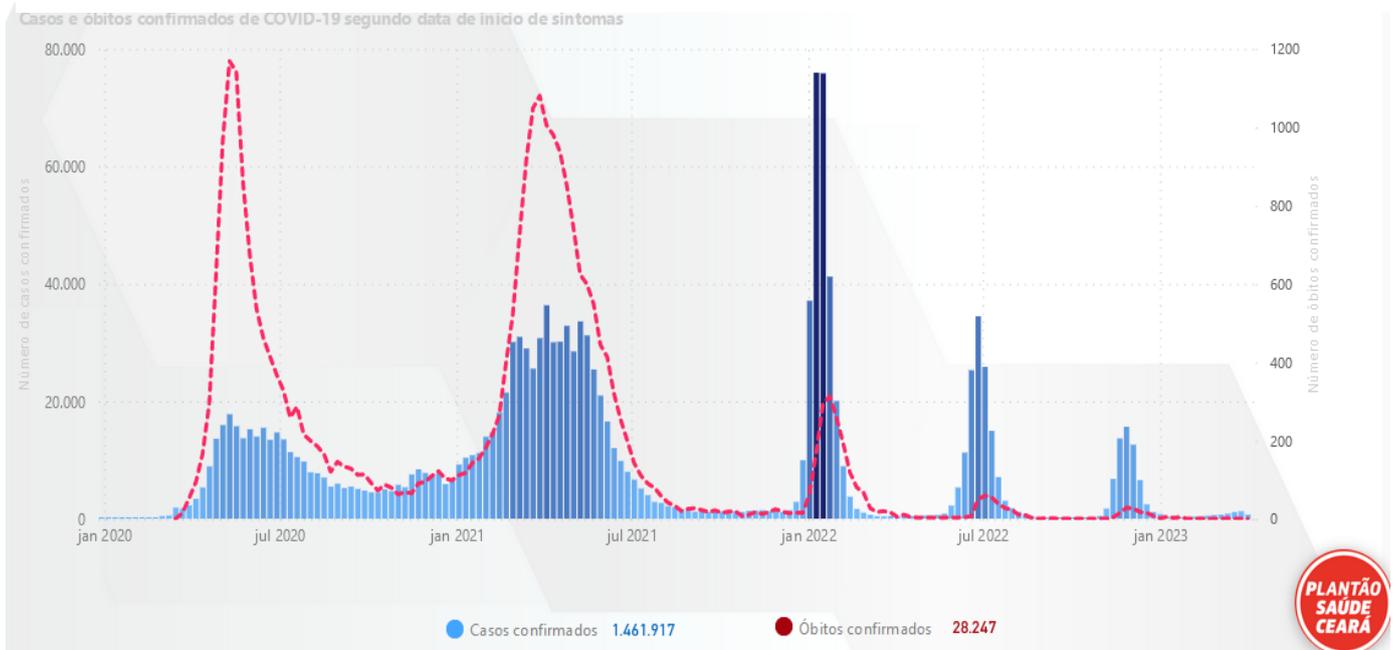
De acordo com o Boletim Epidemiológico nº19, divulgado no início de setembro de 2022 pela Secretaria Estadual de Saúde do Ceará, Fortaleza e Caucaia apresentaram o maior número de casos desde o início da pandemia no estado. Com relação ao número de casos por faixa etária e sexo, 43% tinham entre 20 e 39 anos e 59,7% eram do sexo feminino. De todos os casos de hospitalização por SRAG pelo SARS-CoV-2 em 2022, 52,2% tinham 60 a 89 anos, evidenciando a maior idade com fator de risco para as formas graves da doença. Dentre os acometidos, 78,8% apresentavam uma ou mais condições ou doenças pré-existentes.

De março de 2020 a 03 de setembro de 2022, foram confirmados 27.650 óbitos por COVID-19 no estado. Em 2022, 166 municípios continuaram registrando óbitos por COVID-19, com destaque para a cidade de Fortaleza. A partir do mês de agosto houve uma redução de 94,0% dos casos e 89,0% dos óbitos em relação ao mês de julho do mesmo ano (SESCE, 2022).

Segundo dados disponíveis no INTEGRASUS (2023), nos últimos 28 dias, o número de novos casos no Brasil foi de 170.862, ocupando o 6º lugar no ranking mundial, enquanto

ocupa o 4º lugar com 1.613 casos em número de óbitos notificados. O Ceará continua em 2º lugar na região nordeste com 1.461.917 dos casos notificados no mesmo período. Em todo o Estado observa-se uma consistente queda na média móvel de casos (Fig. 2).

Fig 2. Casos e óbitos confirmados de COVID-19 no Ceará.



Fonte: Integrasus. Saúde Digital. LACEN. Acesso em: 10/04/2023

Epidemias provocadas por vírus respiratórios de grande circulação podem provocar várias ondas ou fases que contextualizam o comportamento da epidemia. A explicação de onda reflete o que mostram os gráficos da evolução da doença em uma determinada região. A primeira onda foi consequência da introdução e dispersão do vírus pelo mundo. Através do sequenciamento genômico do *SARS-CoV-2* foi possível identificar e monitorar novas variantes que se espalharam por diferentes países.

A OMS, em colaboração com autoridades nacionais, instituições e pesquisadores, avalia rotineiramente as variantes de *SARS-CoV-2* alteraram sua forma de transmissão ou as características da infecção. Qualquer alteração pode afetar a eficácia das vacinas, as terapêuticas, os diagnósticos e as medidas sociais aplicadas para controlar a doença. Potenciais variantes de preocupação (VOCs), variantes de interesse (VOIs) ou variantes sob monitoramento (VUMs) são avaliadas regularmente com base no risco para saúde pública mundial (OMS, 2022).

As variantes de preocupação estão associadas a alterações com um alto grau de significância para a saúde pública global e podem apresentar uma ou mais das seguintes características, como o aumento da transmissibilidade e da virulência, mudanças na

apresentação clínica da doença, levando a uma diminuição da eficácia das medidas sociais e de saúde pública ou diagnósticos, vacinas e terapias disponíveis. As principais são: Alfa (B. 1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P1), Delta (B.1.617.2). As variantes de interesse ou de monitoramento devem conter mutações no seu genoma original que modificam o fenótipo do vírus, sendo identificadas como causadoras de transmissão comunitária, de múltiplos casos de COVID-19 ou se for detectada em vários países. Essas são: Epsilon (B.1.427/B.1.429), Zeta (P.2), Eta (B.1.525), Theta (P.3), Iota (B.1.526), Kappa (B.1.617.1) e Lambda (C. 37) (OPAS, 2023).

No Brasil, o levantamento sobre as variantes avaliou o comportamento de cada uma das cinco ondas que o país enfrentou e apontou que, em cada uma, houve o surgimento e predomínio de uma variante do vírus *SARS-CoV-2* com características diferentes tanto de transmissibilidade quanto de letalidade. As linhagens *SARS-CoV-2* B.1.1.28 e B.1.1.33 encontradas na maioria das regiões brasileiras, e as linhagens B.1.1 e B.1.195 em alguns estados específicos, impulsionaram a epidemia no país durante o ano de 2020 (GRAF *et al.*, 2022).

As primeiras cepas identificadas no Brasil, ocorreu nos primeiros meses de 2020, com a predominância da variante B.1.1.33. A 2ª onda ocorreu entre os meses de novembro de 2020 e janeiro de 2021, com predomínio da P.2 (Zeta), identificada primeiramente no Rio de Janeiro e depois nos demais Estados. A 3ª onda teve início em fevereiro de 2021, com a entrada da variante P.1 (Gama) por Manaus. Esta teve o maior número de casos, mortes e duração, ocorrendo até meados do mês de junho do mesmo ano (VOLOCH *et al.*, 2021). Em agosto de 2021, o país entrou na 4ª onda com a chegada da variante Delta. Seu diferencial foi ocorrer após o início da campanha de vacinação em janeiro de 2021, mostrando-se menos transmissível que as anteriores e com baixos índices de internações e óbitos.

A última onda de variantes do *SARS-COV-2* identificada no Brasil, teve início em dezembro de 2021 com a entrada da variante BA.1 (Ômicron). Até o momento, esta foi a onda que apresentou a curva mais elevada de casos, mas que representou o menor número de internações e óbitos, refletindo a efetividade da vacinação contra a COVID-19 (Observatório FIOCRUZ, 2022).

A partir de 15 de março de 2023, o sistema de rastreamento de variantes da OMS passou a considerar a classificação das sublinhagens da Ômicron de forma independente, podendo ser classificadas em um dos dois critérios, de interesse ou de preocupação. O boletim epidemiológico aponta que, entre 2 de dezembro de 2022 e 2 de janeiro de 2023, 103.723 sequências registradas no banco de dados internacional GISAID eram pertencentes à variante Ômicron. BA.5 e suas linhagens descendentes permanecem dominantes globalmente,

respondendo por 63,7% dos casos, embora sua prevalência esteja diminuindo dando espaço a outras sublinhagens (OMS, 2023).

Na semana de 12 a 18 de dezembro de 2022, a OMS observou o aumento da prevalência da variante XBB, incluindo a XBB.1.5 a nível mundial. Estas variantes foram responsáveis pelo aumento de casos de COVID-19 nos Estados Unidos neste período. No Brasil o primeiro sequenciamento destas sublinhagens ocorreu em fevereiro de 2023. A OMS afirma que, com base nas evidências atuais, não há indicação de aumento da gravidade associada a essas variantes quando comparadas a antigas linhagens da Ômicron (OMS, 2023).

1.3. CORONAVÍRUS

A infecção por coronavírus em humanos é comumente associada a casos leves a graves, que podem gerar complicações e resultar em óbito. Os surtos de síndromes respiratórias causada pelo *SARS-CoV* em 2002 e pelo *MERS-CoV* em 2012, demonstraram a possibilidade de transmissão animal-humano e humano-humano pelos coronavírus emergentes (CHEN *et al.*, 2020).

Todos os CoVs que infectam humanos são zoonóticos. Tem uma extensa e variada gama de hospedeiros naturais e afetam vários sistemas no organismo, simultaneamente (DHAMA *et al.*, 2021). Em particular, os morcegos são considerados como um reservatório chave desta família de vírus. Estudos apontam que o poder de voo dos morcegos associado à capacidade de migrar para regiões longe do local de origem e de viverem em alta densidade populacional provocou uma forte pressão seletiva para a coexistência com o vírus (REN *et al.*, 2020). Além disso, o sistema imunológico dos morcegos é conhecido como permissivo, o que significa que eles podem atuar como um reservatório de coronavírus sem desenvolver a doença (SOUZA *et al.*, 2021).

São classificados taxonomicamente pela ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, subfamília *Orthocoronavirinae*, sendo subdividido em quatro gêneros, *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*. Os gêneros *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus* evoluíram de aves e suínos. Já *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* são originários de morcegos e possuem a capacidade de atravessar a barreira animal-humano mais facilmente, o que os torna clinicamente relevantes para a transmissão de doenças nos seres humanos (DHAMA *et al.*, 2021).

São vírus de RNA de fita simples de sentido positivo, não segmentado e de cerca de 30 kb, envoltos por envelope lipídico contendo o nucleocapsídeo viral disposto em simetria

helicoidal. Possuem os maiores genomas entre todos os vírus RNA conhecidos. Embora os vírus de RNA sejam frequentemente caracterizados por suas altas taxas de mutação, a recombinação também pode ser de importância evolutiva e tem sido associada a características como a capacidade de infectar novos hospedeiros e alterar a virulência (HOKELLO *et al.*, 2020).

Uma característica destes vírus é a capacidade de transcrever RNAs mensageiros para cada proteína, o que permite o controle da taxa de síntese de acordo com as características do vírus e da célula hospedeira. O ciclo de replicação dos CoVs apresenta as etapas de adesão, entrada, tradução da enzima viral, transcrição e replicação do genoma, tradução de proteínas estruturais, montagem e liberação do vírus (BORGES *et al.*, 2020).

Os genomas de CoVs contêm um número variável ORFs. O primeiro ORF (ORF-1a e ORF-1b) é responsável por dois terços do genoma de RNA viral e codifica duas poliproteínas e mais 16 proteínas não estruturais (NSP) envolvidas na transcrição e replicação do vírus. As ORFs restantes codificam proteínas acessórias e estruturais, incluindo quatro proteínas essenciais, a glicoproteína Spike (S), proteína de envelope (E), matriz proteica (M) e proteína do nucleocapsídeo (N), enquanto as proteínas acessórias são ORF 3a, ORF 6, ORF 7a, ORF 7b, ORF 8 e ORF 10 (HELMY *et al.*, 2020).

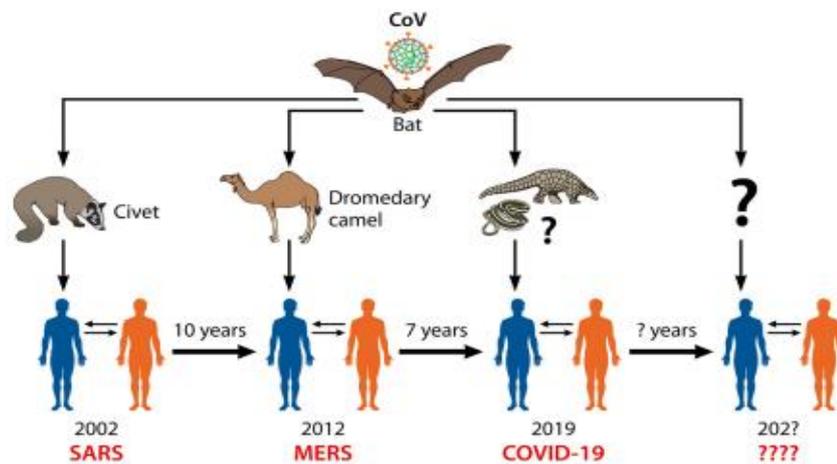
A proteína S é fortemente glicosilada formando picos homotriméricos na superfície viral, que medeia a entrada do vírus nas células hospedeiras. A proteína M é a mais abundante e em conjunto com a proteína E confere a forma ao vírus. A principal função do proteína E é liberar as partículas virais das células hospedeiras enquanto a proteína N é necessária para o empacotamento do RNA durante a montagem viral (HOKELLO *et al.*, 2020). Como porta de entrada no hospedeiro os coronavírus utilizam o *ACE-2* como receptor celular e infectam, principalmente, células epiteliais brônquicas ciliadas e pneumócitos tipo II (CUI *et al.*, 2019).

1.4. SARS-COV-2

O *SARS-CoV-2* pertence à linhagem Betacoronavírus, a mesma do ramo evolutivo do *SARS-CoV* e *MERS-CoV*, conferindo várias características estruturais, genéticas e patogênicas. Embora haja falta de evidências conclusivas, alguns estudos propuseram uma explicação plausível para a origem da *SARS-CoV-2*. Zhou *et al.* (2020) mostrou que o *SARS-CoV-2* provavelmente evoluiu de morcegos colonizadores naturais de coronavírus semelhantes ao SARS. Os resultados indicaram a relação mais próxima de *SARS-CoV-2* com o vírus batCov RatG13 (*Rhinolophus affinis*), corroborando com a hipótese de que os morcegos são um reservatório para o *SARS-CoV-2*. No entanto, embora esses dois coronavírus sejam quase

idênticos genomicamente (96%), a proteína RaTG13 S diverge no RBD, sugerindo que pode não se ligar diretamente ao *ACE-2* humano. Os Pangolins (*Manis javanica*) são considerados os prováveis reservatórios intermediários ou amplificadores, pois os coronavírus desta espécie animal exibem alta semelhança com o RBD da proteína S de SARS-CoV-2. Ainda assim, nem os coronavírus de morcego nem de pangolim têm sítios de clivagem polibásica, sequência responsável por determinar a infectividade viral no hospedeiro. Mutações, inserções e deleções podem ocorrer perto da junção S1-S2 da proteína S do SARS-CoV-2, aumentando a transmissão entre a linha mamífero-humano e de humano para humano, permitindo a rápida disseminação do SARS CoV-2 para o status de pandemia (SOUZA *et al.*, 2021) (Fig.3).

Fig 3. Origem dos Coronavírus. Hospedeiro original e hospedeiros intermediários.



Fonte: Adaptado de DHAMA *et al.*, 2020.

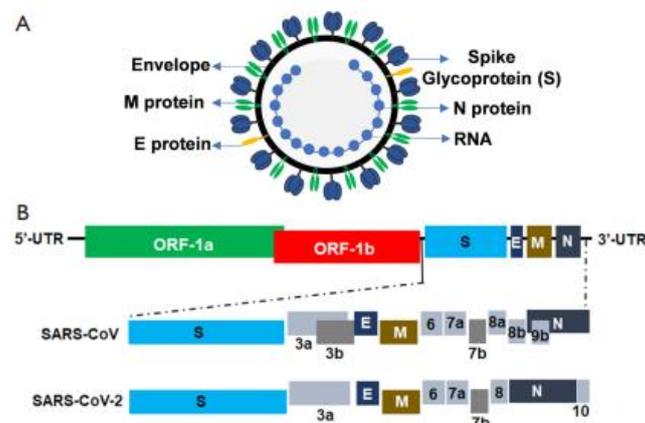
Com base na caracterização molecular, o SARS-CoV-2 é considerado um novo *Betacoronavírus* pertencente ao subgenero *Sarbecovirus*. Seu genoma viral contém características distintas dos demais CoVs, pois possui um fragmento N-terminal exclusivo dentro da proteína spike. Outra notável diferença entre o *SARS-CoV-2* e outros CoVs é a identificação de uma nova proteína dentro da banda ORF3, secretada com uma alfa hélice e uma folha beta, com seis fitas codificadas por ORF8 (DHAMA *et al.*, 2020).

O *SARS-CoV-2* liga-se ao *ACE-2* por meio proteína Spike e permite que o vírus se espalhe, entre e infecte as células. Para que o vírus complete entrada na célula após este processo inicial, a proteína Spike tem que ser iniciada por uma enzima chamada protease. Semelhante ao *SARS-CoV*, o *SARS-CoV-2* usa a protease TMPRSS2 para ligar a proteína S ao *ACE-2* da célula do hospedeiro (MOUSAVIZADEH, GHASEMI, 2021).

A glicoproteína spike (S) forma trómeros na superfície do vírus e se liga ao receptor de *ACE-2* para entrada na célula do hospedeiro. Ela contém duas subunidades, S1 e S2, com um sítio polibásico na junção, o que permite clivagem eficaz por furina e outras proteases. Este sítio de clivagem é importante fator de virulência, aumentando a replicação do vírus e o tropismo a múltiplos tecidos. Além disso, a proteína S tem os principais epítomos imunogênicos, particularmente concentrados no domínio N-terminal (NTD) e no domínio de ligação do receptor (RBD) da subunidade S1, que são alvos de anticorpos neutralizantes. A proteína do envelope (E) forma uma viroporina, que é importante na montagem e liberação dos vírions. A proteína de membrana (M) é estrutural e abundantemente expressa dentro do envelope lipídico que também é importante para a morfogênese viral e supressão de interferon. Já a proteína do nucleocapsídeo (N) estabiliza o genoma do RNA em um complexo helicoidal e serve como um alvo da imunidade adaptativa (TO *et al.*, 2021).

Com relação às proteínas acessórias, a ORF3a pode funcionar como um indutor de apoptose (REN *et al.*, 2020). Tanto ORF6 e ORF8 estão envolvidos no antagonismo do interferon enquanto ORF7a inibe a tradução celular. A proteína imunogênica ORF8, se liga ao receptor de IL-17A (IL17RA) modulando a resposta inflamatória. Maiores níveis sanguíneos de IL17A tem sido associado com doença mais branda (YUEN *et al.*, 2020). Variantes circulantes do SARS-CoV-2 com deleções e perda de função em ORF3b, ORF7a/7b e ORF8 foram encontradas, indicando que estas proteínas acessórias não são essenciais para o processo de infecção viral no hospedeiro (YOUNG *et al.*, 2020) (Fig.4).

Fig.4. (A)Esquema da estrutura viral do SARS-CoV-2. (B)Organização estrutural do genoma do SARS-CoV-2.



Fonte: Adaptado de HOKELLO *et al.*, 2020

1.4.1.Replicação viral

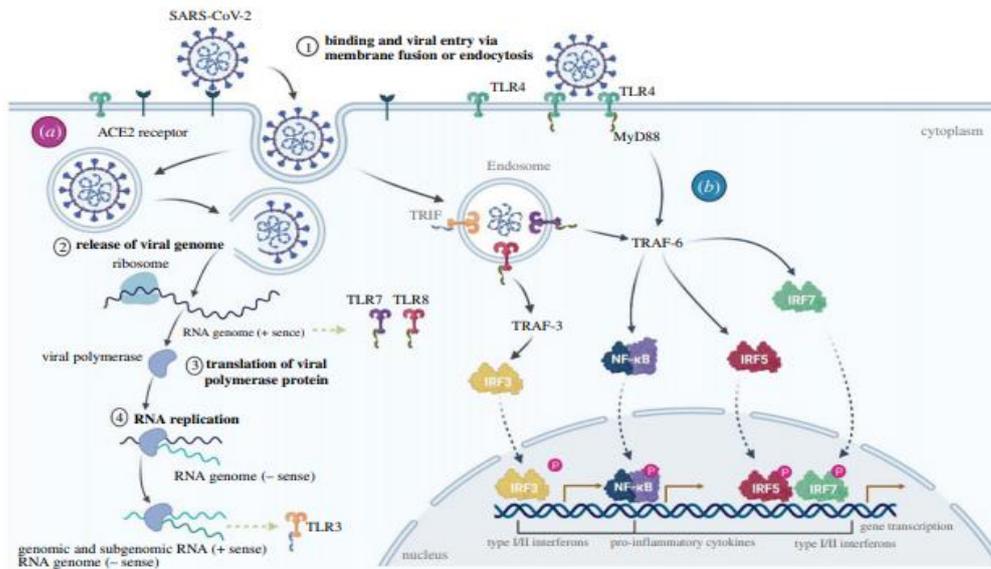
Após a entrada do *SARS-CoV-2* na célula hospedeira o genoma é transcrito e traduzido. A replicação e a transcrição do genoma ocorrem nas membranas citoplasmáticas e envolvem processos coordenados de síntese contínua de RNA.

O processo de replicação começa na etapa de adsorção, quando a região RBD da subunidade S1 da glicoproteína S interage com receptores de membrana da célula hospedeira (FEHR; PERLMAN, 2015). A região RBD da glicoproteína S possui uma afinidade muito grande com o receptor *ACE-2* da célula hospedeira. Após a adsorção da partícula viral na célula alvo, ocorre a clivagem da glicoproteína S, entre as subunidades S1 e S2, através da ação de proteases celulares que mediarão a junção do envelope viral com a membrana celular do hospedeiro. Uma forma alternativa para entrada do *SARS-CoV-2* na célula é por via endocítica, quando é clivado por catepsinas lisossomais. Na próxima etapa ocorre a liberação do material genético do vírus no citoplasma celular, chamado de desnudamento do RNA (BORGES *et al*, 2020). Devido à polaridade positiva do RNA do *SARS-CoV-2*, ele pode ser transcrito de forma imediata pelas ORF1a e ORF1b e codificado para as poliproteínas pp1a e pp1b, sendo estas clivadas pelas NSPs através das proteases e outras enzimas transcriptases. Todo esse aparato funciona para a síntese do RNA viral, formando RNA genômico para a formação de novas partículas virais e RNA subgenômico com a função de mRNA (FEHR; PERLMAN, 2015).

Os RNAs subgenômicos virais são traduzidos nas proteínas estruturais M, E e S no Retículo Endoplasmático Rugoso, e seguem para o Complexo de Golgi, onde serão secretados (FEHR; PERLMAN, 2015). Nessa etapa, os domínios S1 e S2 da proteína S podem ser ativados proteoliticamente por furinas, que possuem afinidade por sítios polibásicos. Os vírions formados possuem uma proteína S “pré-ativada” com uma maior capacidade de mediar a fusão célula-célula o que favorece a disseminação viral e facilita sua ação no sistema imune do hospedeiro. Esse mecanismo tem sido apontado como um dos fatores relacionados à maior patogenicidade de *SARS-CoV-2* em relação a outros CoVs. Estudos recentes mostram que mutações no sítio polibásico do *SARS-CoV-2* resultaram em uma diminuição na entrada do vírus em células pulmonares humanas (HOFFMANN *et al.*, 2020).

Na etapa final, ocorre a montagem dos vírions maduros pela associação da proteína N ao RNA em conjunto com as proteínas estruturais. Dessa forma, os vírions são transportados para a superfície celular, onde ocorre a liberação das partículas virais para o fluido extracelular (BORGES *et al.*, 2020) (Fig.5).

Fig 5. Entrada e replicação viral, seguido de resposta imune do hospedeiro.



Fonte: Adaptado de FARA *et al.*, 2020

1.4.2. Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico rápido e preciso da infecção por *SARS-CoV-2* é a parte fundamental no controle da doença e na melhora do prognóstico. Isso depende de vários critérios, incluindo o conhecimento da epidemiologia da doença, o histórico de casos, sintomas clínicos, exames adequados, isolamento oportuno, rastreamento de contatos e tratamento. O acompanhamento rigoroso dos pacientes clinicamente suspeitos é considerado o primeiro passo no diagnóstico precoce da COVID-19 (HELMY *et al.*, 2020).

Apenas alguns dias depois da confirmação dos primeiros casos, foi apresentado um fluxo validado diagnóstico para *SARS-CoV-2* (KAMPS; HOFFMANN, 2021). Em 2 de março de 2020, a OMS publicou as orientações provisórias para testes laboratoriais de casos suspeitos, com precauções para coleta de amostras, embalagem, envio e amplificação de ácido nucleico para detectar genes virais (HELMY *et al.*, 2020). As recomendações são constantemente atualizadas por autoridades sanitárias e instituições de pesquisa sobre quem deve ser testado e quando. Essas recomendações estão em constante mudança e devem ser adaptados à situação epidemiológica local. Quanto mais baixas as taxas de infecção e maior a capacidades dos testes, mais indivíduos são testados (OMS, 2020).

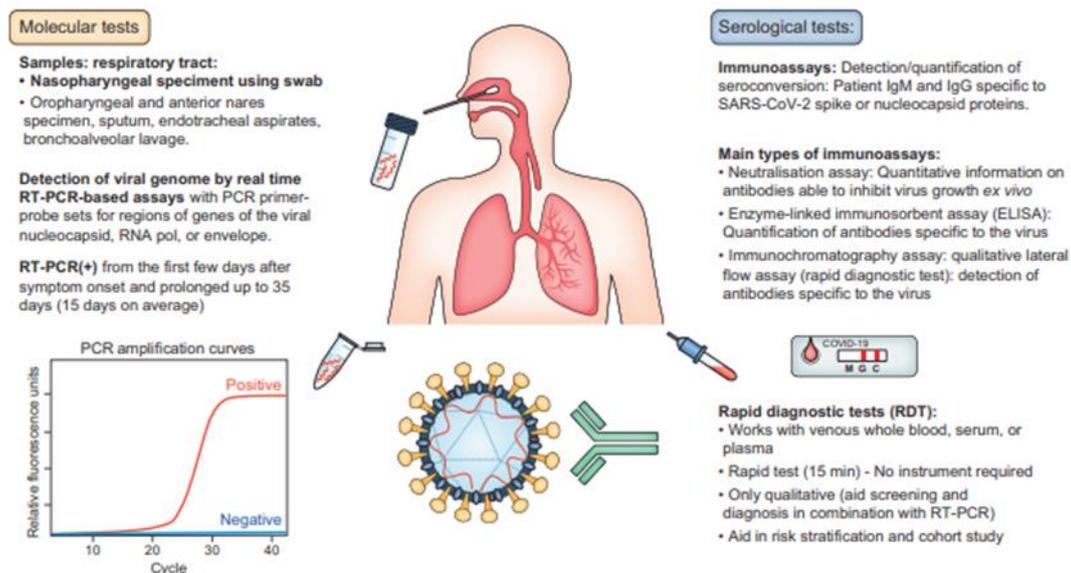
O *SARS-CoV-2* pode ser detectado em uma ampla gama de diferentes tecidos e fluidos corporais. Embora as secreções respiratórias possam ter uma composição variável, as amostras respiratórias continuam sendo o tipo de amostra de escolha para os diagnósticos. A replicação viral do *SARS-CoV-2* é muito alta nos tecidos do trato respiratório superior, principalmente, nos primeiros dias de sintomas (TO *et al.*, 2021). Cargas virais mais altas podem estar associadas a

desfechos clínicos graves (KAMPS;HOFFMANN, 2021).

Vários estudos mostram que indivíduos assintomáticos apresentam RT-PCR positivo e podem transmitir o vírus com níveis de carga viral semelhante aos sintomáticos. Em pacientes sintomáticos, a disseminação viral pode começar 2 a 3 dias antes do aparecimento dos primeiros sintomas (KAMPS; HOFFMANN, 2021).

Os testes para COVID-19 podem ser agrupados em ácido nucleico, testes sorológicos, antigênicos e auxiliares, todos os quais desempenham papéis distintos na população testada (ASSELAH *et al.*, 2021). A detecção de RNA (RT-PCR) em amostras respiratórias é padrão ouro para o diagnóstico. Segundo a OMS, a coleta com *swab* na região orofaríngea e nasofaríngea é adequada para infecção em estágio inicial, especialmente assintomática ou infecções leves do trato respiratório superior. Além disso, podem ser coletadas amostras de escarro, aspiração endotraqueal ou lavagem broncoalveolar, quando a infecção ocorre no trato respiratório inferior. No entanto, a sensibilidade do teste varia de acordo com os dias de início dos sintomas ou a partir do momento da exposição ao vírus. Dessa forma, testes sorológicos de antígenos e anticorpos, exames de imagem e outros laboratoriais também podem auxiliar no diagnóstico presuntivo (WIERSINGA *et al.*, 2020) (Fig.6).

Fig. 6. Tipos de testes para detecção do SARS-CoV-2 por via respiratória superior.



Fonte: Adaptado de ASSELAH *et al.*, 2020

Diversos ensaios de RT-PCR personalizados para o *SARS-CoV-2* estão disponíveis em todo o mundo. Uma PCR qualitativa, com resultados positivos e negativos, costuma ser suficiente no diagnóstico de rotina. A técnica usa primers direcionados a diferentes seções da sequência genética do vírus, como nas proteínas estruturais S, E, helicase (hel), N, M, regiões não estruturais e outros alvos, a exemplo dos ORF1a ORF1b (TO *et al.*, 2021). Ainda não há consenso sobre qual gene confere a melhor performance diagnóstica, mas sabe-se que as mutações podem afetar a sensibilidade de detecção por RT-PCR (KAMPS; HOFFMANN, 2021).

A glicoproteína N que é expressa de forma abundante no *SARS-CoV-2* é amplamente utilizada como alvo em teste de antígeno para infecção por COVID-19. A detecção é conseguida pela captura do antígeno viral por anticorpos monoclonais fixados em uma membrana de imunoensaio colorimétrico, realizado como POCT. Os POCTs são dispositivos fáceis e de rápida detecção (aproximadamente 15 minutos) que facilitam o uso do teste fora do ambiente laboratorial. Estes testes tem menor sensibilidade quando comparados com ensaios de RT-PCR especialmente para amostras com baixa carga viral (TO *et al.*, 2021)

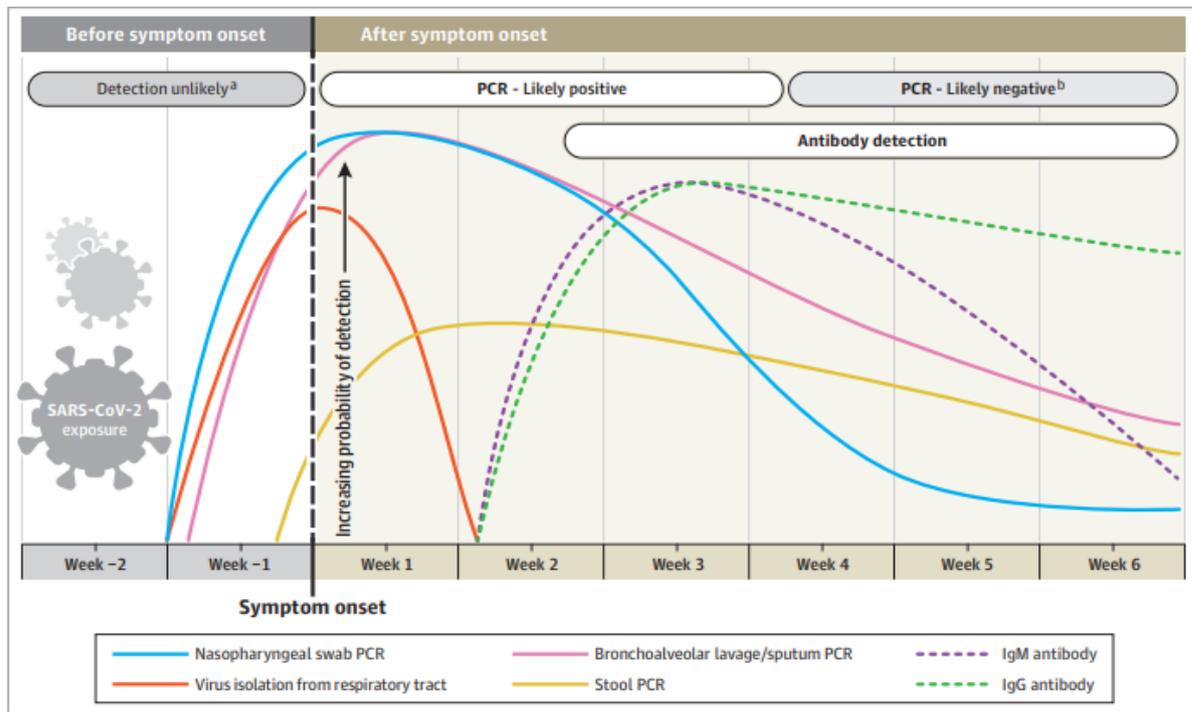
O teste que utiliza anticorpos não é recomendado para fins de tratamento, mas pode ser usado para diagnóstico retrospectivo e estudo de soroprevalência para entender a imunidade dos infectados. As técnicas comumente empregadas são fluxo lateral, ensaios quimioluminescentes, imunofluorescentes e imunoensaios ligados a enzimas (TO *et al.*, 2021). Testes sorológicos podem ser uma ferramenta para diagnóstico complementar da COVID-19, já que os Acs podem ser detectados nos estágios intermediários e avançados da doença. A sensibilidade e especificidade média dos testes de anticorpos aprovados é de 84,9% e 98,6%, respectivamente.

A publicação de uma revisão sistemática avaliou 40 estudos sobre sensibilidade e especificidade, estratificados por métodos de testes sorológicos (ensaios imunoenzimáticos - ELISA), imunoensaios de fluxo lateral (LFIA) ou imunoensaios quimioluminescentes - CLIA) (LISBOA-BASTOS *et al.*, 2020). A sensibilidade combinada de ELISAs medindo IgG ou IgM foi de 84,3% (IC 75,6% a 90,9%), de LFIA foi 66,0% (IC 49,3% a 79,3%) e de CLIA foi de 97,8% (IC 46,2% a 100%). Diferentes kits de ELISA baseados em proteína nucleocapsídica recombinante e proteínas spike são usados. A proteína spike (S) do *SARS-CoV-2* parece ser o melhor alvo, mas ainda não se sabe qual parte específica da proteína S que é mais efetiva para diagnóstico. Quanto mais exclusivo for o teste, menores serão as chances de reação cruzada com outros coronavírus, provocando resultados falso-positivos (KAMPS; HOFFMANN, 2021).

A tomografia computadorizada (TC) pode desempenhar um papel tanto no diagnóstico quanto na avaliação da extensão da doença e no acompanhamento. A TC de tórax tem uma sensibilidade relativamente alta para diagnóstico de COVID-19. No entanto, cerca de metade dos pacientes pode ter uma TC normal durante os primeiros 1-2 dias após o início dos sintomas (KAMPS;HOFFMANN, 2021).

Grande parte das técnicas disponíveis é clinicamente útil para todos os tipos de populações. O curso de tempo da positividade do PCR e a soroconversão pode variar em crianças e outros grupos, incluindo indivíduos assintomáticos que não são diagnosticados e por essa razão, não são notificados. Algumas questões ainda precisam ser discutidas, como o tempo de duração da imunidade potencial para todos os indivíduos infectados pelo *SARS-CoV-2* (SETHURAMAN *et al.*, 2020) (Fig.7).

Fig. 7 - Tempo de intervalo estimado e taxa de detecção viral



Fonte: Adaptado de SETHURAMAN *et al.*, 2020

1.4.3. Imunofisiopatologia do SARS-CoV-2

Além dos aspectos virológicos do SARS-CoV-2, também é fundamental entender os fatores imunológicos provocados pela infecção no hospedeiro e como essa interação pode estar envolvida na patogênese da doença. Vários mecanismos patogênicos podem estar envolvidos na COVID-19, como coagulopatia, disfunção endotelial e liberação excessiva de citocinas pró-inflamatórias (ASSELAH *et al.*, 2020).

A fisiopatologia da doença pulmonar causada pelo *SARS-CoV-2* é muito semelhante à descrita para *SARS-CoV* e *MERS-CoV*, com lesão pulmonar associada a uma agressiva resposta inflamatória. A base patológica ocorre por dano às células pulmonares infectadas, principalmente em pneumócitos tipo II e células endoteliais capilares, levando à hipoxemia e formação de exsudato plasmático nos espaços alveolares (BOECHAT *et al.*, 2021). Estudos histopatológicos confirmaram lesão alveolar difusa, com formação de membranas hialinas, infiltração de células mononucleares e macrófagos, além de espessamento nas paredes dos alvéolos (XU *et al.*, 2020).

As infecções causadas por coronavírus, em especial pelo *SARS-CoV-2*, podem desregular as respostas da imunidade inata e adaptativa nos indivíduos contaminados. A linfopenia é uma característica comum em pacientes graves com COVID-19, incluindo uma redução drástica nas células T (CD4+ e CD8+) e células B (CD19+) (JAMAL *et al.*, 2021). Os linfócitos T contribuem para a hiperinflamação na COVID-19. Estas células juntamente com as NK são os defensores da linha de frente para controle das infecções virais e uma resposta imune desregulada pode levar à doença grave (JAMAL *et al.*, 2021). Liu e colaboradores observaram uma correlação negativa entre o RNA viral e os linfócitos T CD4+ e CD8+ em pacientes graves, sugerindo que a redução dessa população celular é influenciada pela alta carga viral do *SARS-CoV-2* associando-se com o pior prognóstico da doença.

Uma célula infectada por qualquer classe de patógenos ativa um grande número de glóbulos brancos, incluindo linfócitos B e T, células NK, macrófagos, células dendríticas e monócitos através de interações ligante e receptor. Isso resulta na liberação de citocinas inflamatórias, que ativam mais glóbulos brancos em um ciclo de feedback positivo. A cascata de citocinas inicia-se localmente e se espalha por todo o corpo através circulação sistêmica. A resposta local destina-se, primeiramente, a eliminar o gatilho por mecanismos de proteção, como aumento do fluxo sanguíneo, extravasamento de leucócitos, proteínas plasmáticas no local da lesão, aumento da temperatura corporal e desencadeamento da dor. Logo após, os processos de reparo são iniciados e podem levar a restauração gradual da função do órgão afetado ou à cicatrização por fibrose, que pode resultar em disfunção orgânica persistente (FARA *et al.*, 2020)

As citocinas são polipeptídeos que atuam como mediadores intercelulares, essenciais para o correto funcionamento do sistema imunológico e envolvidos em uma multiplicidade de processos fisiopatológicos fundamentais para a sobrevivência, como inflamação, reparo tecidual, fibrose e coagulação. No entanto, quando produzidos em excesso devido a uma disfunção do sistema imunológico, as citocinas podem se tornar prejudiciais ao organismo,

levando a um estado de hiperinflamação denominada de Tempestade de Citocinas (CS). A CS é considerada uma doença imunológica característica da COVID-19 (FARA *et al.*, 2020).

Os macrófagos ativados, são um exemplo de células que participam ativamente na CS, pois são responsáveis por produzir várias citocinas pró-inflamatórias. Macrófagos hemofagocíticos são frequentes na medula óssea e em outros tecidos contribuindo para a citopenia comumente observada nesta condição. Estudos mostram que os pacientes com COVID-19 possuem níveis de citocinas inflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , IP-10, GM-CSF e MCP- 1, e que elas correlacionam-se com a gravidade da doença (DEL-VALE *et al.*, 2020). Células infectadas apresentam uma capacidade prejudicada de produzir interferons, mediadores de uma resposta adequada do hospedeiro contra infecções virais, e ao mesmo tempo, produzindo altos níveis de quimiocinas que recrutam mais neutrófilos e macrófagos (ZANZA *et al.*, 2022). Jiadi Lv e colaboradores observaram que o SARS-CoV-2 sobrevive e se replica dentro de macrófagos. Dessa forma, o sistema imune pode não ser eficiente na retirada das células infectadas favorecendo uma maior replicação do vírus.

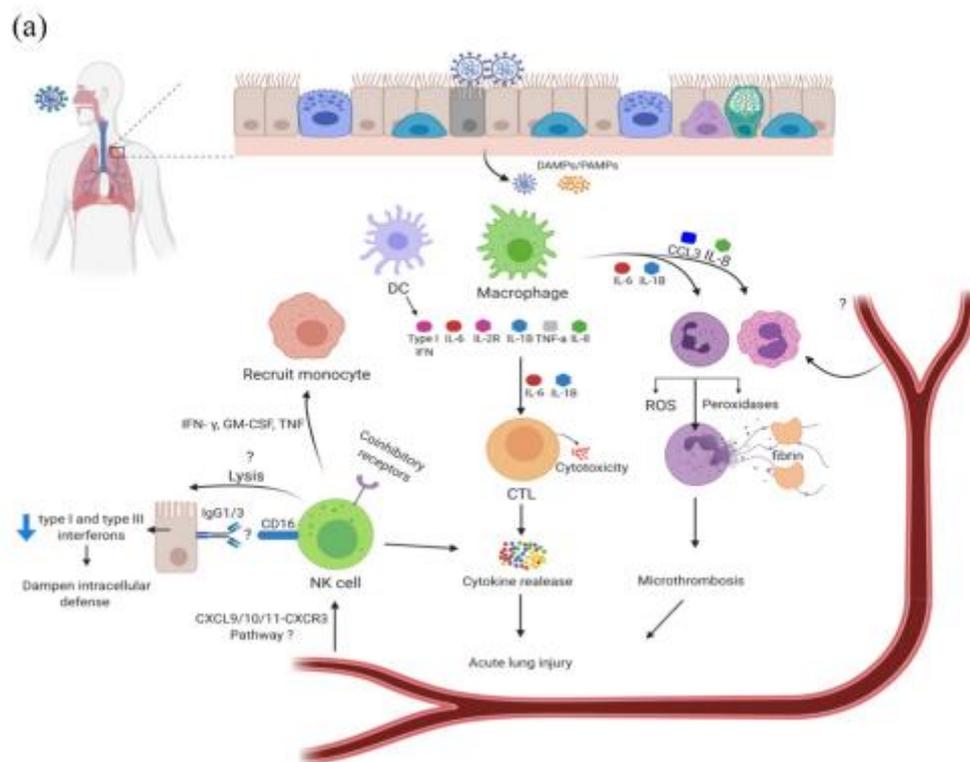
Como já mencionado, um desequilíbrio no sistema imunológico inato pode ser um dos fatores desencadeantes da proliferação viral e desregulação imunológica, com consequências na atuação da resposta imune adquirida, o que contribui para a expansão e perpetuação dessa desregulação. Alguns vírus, como o SARS-CoV, são citopáticos, ou seja, induzem dano celular e morte nos tecidos infectados por piroptose (TAY *et al.*, 2020). Os componentes liberados pela lise de células do epitélio respiratório, como ATP e DNA podem ser detectados como DAMPs pelos PRRs de outras células epiteliais e macrófagos alveolares, resultando em maior ativação celular (BOECHAT *et al.*, 2021). O aumento da concentração de IL-1, uma das citocinas pró-inflamatórias liberadas durante a piroptose, foram recentemente relatados em pacientes com infecção por SARS-CoV-2 (HUANG *et al.*, 2020) (Fig.8).

A hiperinflamação crônica e tardia nos indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2 provoca aumento de várias proteínas séricas de fase aguda, como a procalcitonina (PCT), amilóide sérica A (SAA), Proteína C reativa (PCR) e ferritina sérica (SF). O SAA foi relatado como um novo indicador para avaliar a gravidade e o prognóstico da doença (JAMAL *et al.*, 2021).

Alguns indivíduos, seja por causa de uma carga viral alta e/ou fatores de risco imunogenéticos individuais, podem experimentar uma resposta imune disfuncional, resultando nesses processos hiperinflamatórios sistêmicos, desencadeado por superprodução de citocinas ou pela síndrome de ativação de macrófagos (MAS). Os indivíduos idosos além de possuírem um sistema senescente, tendem a apresentar comorbidades subjacentes, como doenças

cardiovasculares, distúrbios hepáticos, doenças renais e malignidades que aumentam a gravidade na COVID-19 (JAMAL *et al.*, 2021).

Fig 8. Mecanismo patogênico, ativação das células imunes e produção de citocinas.



Fonte: Adaptado de JAMAL *et al.*, 2021.

1.4.4. Tratamentos e Vacinas

Até o momento, não existe um tratamento específico para a infecção pelo SARS-CoV-2. Os tratamentos atuais para casos leves de COVID-19 é semelhante ao recomendado para outras infecções respiratórias causadas por vírus. As medicações prescritas pelos médicos são geralmente para alívio dos sintomas. Mais de 150 medicamentos estão em estudo com o objetivo de tratar a causa da doença, entre eles antivirais, anti-inflamatórios e anticorpos. Os mais importantes seriam aqueles capazes de diminuir as chances de casos leves evoluírem para casos graves, reduzindo os óbitos (MS, 2022).

Com base no entendimento da patogênese da COVID-19 acredita-se que as terapias antivirais teriam o maior efeito no início do curso clínico da doença, momento que é marcado pela replicação do vírus, enquanto as terapias imunossupressoras ou anti-inflamatórias

mostrariam mais vantagens nos estágios tardios quando a COVID-19 é impulsionada por uma resposta imune e inflamatória desregulada ao *SARS-CoV-2* que leva a danos teciduais. Segundo o relatório de recomendações de Protocolos clínicos e Diretrizes terapêuticas elaborado pela CONITEC, poucas terapias medicamentosas mostraram-se eficazes na ação da resposta imunomoduladora no tratamento de pacientes hospitalizados. O uso de anticoagulação terapêutica por risco de sangramento ainda é incerto. Para o tratamento de pacientes hospitalizados não críticos, seu uso é sugerido em doses terapêuticas, enquanto em pacientes críticos deve ser utilizado dose de profilaxia para tromboembolismo venoso. Importante ressaltar que antimicrobianos só devem ser utilizados quando houver presença ou suspeita de infecção bacteriana associada, e nunca como rotina (BRASIL, 2022).

As vacinas contra COVID-19 são fundamentais para a prevenção dos casos graves e diminuição da mortalidade. De acordo com a OMS (2023), 13.337.416.815 de doses de vacinas foram aplicadas globalmente, sendo que o Brasil foi responsável por 511.350.453 administrações até 06 de abril de 2023. Os imunizantes administrados na população, possuem plataformas diferenciadas. A primeira vacina a ser autorizada pela ANVISA no Brasil foi a CoronaVac, fabricada pelo Instituto Butantan em parceria com a Sinovac, constituída por vírus inativado. Além dela, outras três também tiveram autorização para serem administradas a vacina da AstraZeneca em parceria com a Universidade de Oxford que utiliza vetor viral de adenovírus de chimpanzé, a da Pfizer que em conjunto com o laboratório BioNTech e Fosun Pharma utiliza a metodologia do RNA mensageiro e a Janssen da Johnson & Johnson que é formada por um vetor viral de adenovírus humanos. Todas as vacinas citadas mostraram eficácia com pelo menos duas doses aplicadas (BRASIL, 2022).

Um dos maiores desafios para a efetividade das vacinas está relacionado à diversidade de variantes que o *SARS-COV-2* apresenta por ser um vírus de fácil mutação e recombinação. Algumas sublinhagens possuem características de escape imunológico muito competentes, exigindo um maior esforço do organismo do hospedeiro na produção de anticorpos de memória. Outra questão está ligada à adesão da população ao esquema vacinal proposto pelos fabricantes dos imunizantes e as autoridades competentes. Questões políticas e de crenças pessoais podem prejudicar toda uma construção pautada na ciência.

2. Justificativa

A pandemia de COVID-19 colocou sérios desafios aos governos, pesquisadores e profissionais de saúde, por isso uma compreensão adequada dos efeitos sistêmicos desse novo coronavírus é importante para sua prevenção e cura. Evidências sugerem desfechos clínicos piores em infecções virais respiratórias em humanos associados a níveis elevados de produção de citocinas e quimiocinas. A fisiopatologia da ação do SARS-CoV-2 envolve a ligação do vírus ao células epiteliais alveolares ativando a sistema imune inato e adaptativo com, conseqüentemente liberação de citocinas. Esses marcadores inflamatórios aumentam a permeabilidade vascular e causam exsudato de um grande número de fluidos e células sanguíneas para os alvéolos, resultando em dispnéia e, eventualmente, insuficiência respiratória que pode levar ao óbito.

A literatura sobre a medição de citocinas como um biomarcador útil no atendimento clínico de pacientes com COVID-19 é muito extensa e mostra que anormalidades precoces nas concentrações de determinadas citocinas estão diretamente ligadas à mortalidade desses indivíduos. Dessa forma, as citocinas e quimiocinas que desempenham um papel mais proeminentes nos pacientes graves podem ser utilizadas como alvos terapêuticos quando é realizado seu bloqueio durante o processo de hiperinflamação.

Com o nosso estudo espera-se ampliar ou confirmar esses achados sobre a concentração de citocinas a fim de auxiliar na compreensão do tipo de prognóstico desenvolvido por determinados pacientes, principalmente em estado crítico. Essas pesquisas são importantes para o controle da doença, na escolha do melhor alvo terapêutico dependendo de cada caso e para a melhor destinação do dinheiro público ou privado investido em tratamentos efetivos.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a associação da concentração de citocinas pró e anti-inflamatórias aos desfechos clínicos de altas e óbitos em pacientes com COVID-19 grave internados na UTI de um hospital de referência de Fortaleza-CE.

3.2 ESPECÍFICOS

- Descrever as características clínicas e sociodemográficas dos sujeitos do estudo;
- Descrever as características laboratoriais na população de estudo de acordo com os níveis de marcadores séricos inflamatórios e contagem de células sanguíneas.
- Avaliar as concentrações das citocinas séricas selecionadas.
- Identificar as citocinas séricas que estão associadas ao desfecho óbito e as associadas ao desfecho altas.
- Verificar associação entre os níveis séricos das citocinas avaliadas com as características laboratoriais, clínicas e sociodemográficas.

4. MÉTODOS

4.1. DESENHO DO ESTUDO E SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES

Este é um estudo observacional e transversal realizado na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Instituto Dr. José Frota (IJF), hospital de nível terciário referência para COVID-19, em Fortaleza, Ceará, Brasil, durante o período de março de 2020 a fevereiro de 2021. Foram selecionados, aleatoriamente, 78 indivíduos admitidos na UTI com testes positivos para a infecção pelo SARS-COV2 e separados segundo os desfechos de alta hospitalar e óbito (Fig.9). O diagnóstico laboratorial foi realizado por teste rápido, baseado na detecção de antígenos, ou pela detecção de RNA viral de swabs nasofaríngeos usando o método de transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).

Os dados sociodemográficos e clínicos foram obtidos a partir da leitura de prontuários eletrônicos disponibilizados no sistema hospitalar “Ars Vitae”. Os resultados laboratoriais e a coleta das amostras de soro são referentes ao dia de admissão dos pacientes em UTI. Como parâmetro para admissão em UTI foi utilizado o escore de classificação da severidade SAPS 3, além do uso de ventilação mecânica invasiva e drogas vasoativas (LÁZARO *et al.*, 2022).

As análises para quantificação das citocinas GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A (CTLA-8), IL-18, IL-2, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, MCP-1 (CCL2) e TNF- α foram realizadas por meio do kit customizado para 20 citocinas Human ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassay for Convenience and Mix&Match Panels da Invitrogen Thermo Fisher (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) com leitura realizada no equipamento MAGPIX ® pela tecnologia Luminex™ systems xMAP™ (Merck, Burlington, MA, EUA), conforme instruções da fabricante.

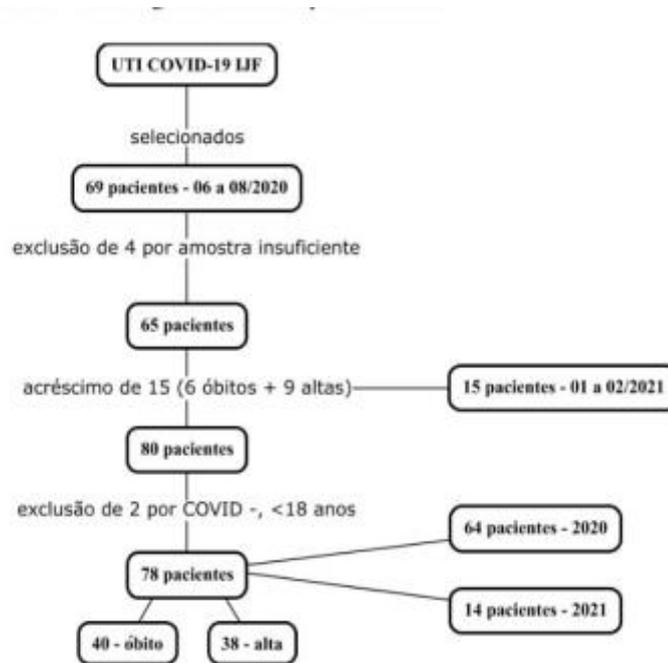
4.2. ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (UFC) através do protocolo nº 4.346.280 (CAAE: 36139220.6.0000.5054). As amostras foram coletadas após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos participantes do estudo ou seus familiares.

4.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Os critérios de inclusão do estudo foram idade igual ou superior a 18 anos; internado em UTI; 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; paciente transplantado; indivíduos em uso de imunossupressores e/ou em tratamento quimioterápico.

Fig. 9. Fluxograma para seleção de amostras



Fonte: Própria autora

4.4. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

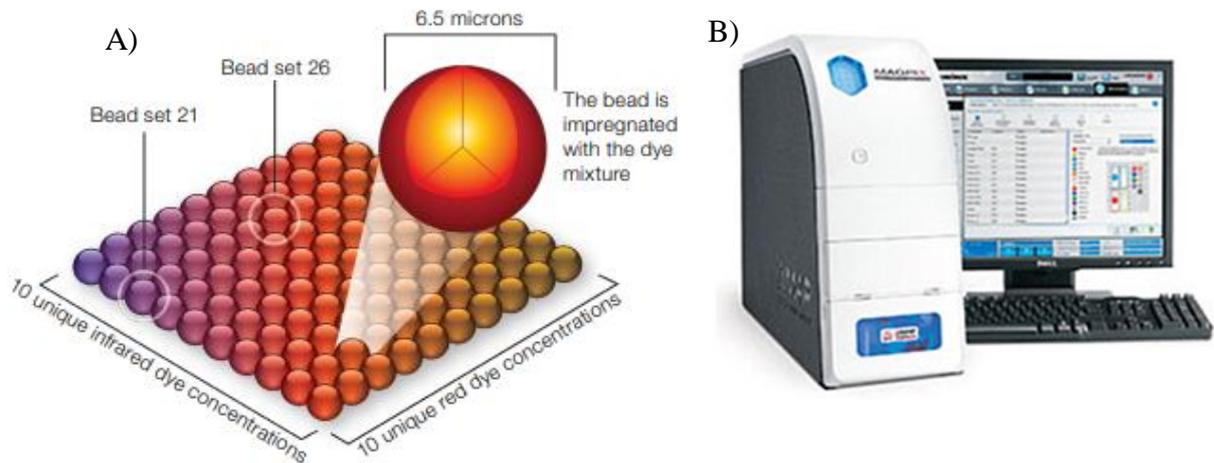
As amostras de soro foram coletadas, em tubos com gel separador, pela equipe hospitalar responsável no primeiro dia de internação em UTI. Após a coleta, os tubos foram centrifugados, as amostras aliqüotadas em *ependorfs* com aproximadamente 1,5 mL e armazenadas em freezer -80 °C até o momento da análise dos biomarcadores.

4.5. QUANTIFICAÇÃO DOS MARCADORES BIOLÓGICOS DO KIT MULTIPLEX/PROCARTAPLEX POR LUMINEX

A quantificação das 20 citocinas do estudo foi realizada pelo kit Multiplex Procartaplex que possui os mesmos princípios do ELISA sanduíche, usando dois anticorpos que se ligam a diferentes epítomos de uma proteína. Nesta técnica em particular, os anticorpos específicos do analito são pré-revestidos com micropartículas magnéticas, as *beads*, incorporadas com fluoróforos em proporções definidas para cada região. *Beads*, padrões e amostras foram pipetadas em poços e os anticorpos imobilizados ligam-se aos analitos de interesse. Após sequências de lavagens, acréscimo de Anticorpos biotinizados, conjugado de Esteptavidina-PE e lavagens finais, as *beads* foram resuspensas em tampão e lidas em

equipamento com tecnologia Luminex xMAP. Neste estudo, o equipamento utilizado para leitura foi o MAGPIX[®] (Merck, MA, EUA) (Fig. 10).

Fig 10. A) Coloração e identificação das *beads*; B) Equipamento MAGPIX



Fonte: Thermo Fisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/br/en/home>

Inicialmente, as amostras foram retiradas do freezer -80°C e descongeladas lentamente em gelo seco para evitar a degradação das citocinas. Enquanto isso, o kit Multiplex/Procartaplex foi retirado da geladeira para que, a placa específica de 96 poços e os reagentes, atingissem a temperatura ambiente ($20\text{-}24^{\circ}\text{C}$). Após o descongelamento, as amostras passaram por vórtex, foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos e mantidas no gelo até seu uso. O preparo do Wash Buffer, a reconstituição dos padrões liofilizados e suas diluições seriadas foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante.

As *beads* pertencem à primeira etapa do ensaio. Para isso, o frasco que as contém passou por vórtex durante 30 segundos para posteriormente serem adicionadas a cada poço da placa com uma pipeta multicanal. A placa foi inserida em uma estante magnética específica para este Multiplex, mantendo as *beads* fixas no fundo dos poços auxiliando de forma segura no seu processo de lavagem. Em seguida, foi adicionado $25\mu\text{L}$ do tampão Universal, $25\mu\text{L}$ dos padrões e $25\mu\text{L}$ de cada amostra em todos os poços. A placa foi selada com papel filme e coberta com a tampa preta específica que acompanha o kit. Sua incubação ocorreu em *overnight* a 4°C em superfície nivelada, após permanecer no homogeneizador de placa durante 30 minutos à temperatura ambiente.

No dia seguinte, a placa foi novamente colocada no homogeneizador durante 30 minutos à temperatura ambiente, antecipadamente aos dois ciclos de lavagens. Após essa etapa,

foi adicionado 25µL do Anticorpo de detecção (biotinilado) em cada poço e a placa incubada por 30 minutos no *shaker* a 500rpm em temperatura ambiente. Mais dois ciclos de lavagens ocorreram antes da adição de 50µL do *SAPE* (Streptavidin R-Phycoerythrin conjugate) quando a placa volta para a mesma configuração de incubação das anteriores. O *Reading buffer* foi acrescentado em cada poço e a placa, incubada por mais 5 minutos no *shaker* a 500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. O ensaio finaliza na leitura realizada pelo equipamento MagPix®.

O MagPix® tem como função a captura e detecção de analitos específicos, representados pela *beads* revestidas por fluoróforos, em uma determinada amostra. Para isso, utiliza uma sonda que aspira a amostra e a transporta através de uma solução fluídica de transmissão para a câmara *CDC* (Charge-cloud device), onde um ímã puxa as microesferas para uma lâmina, as imobiliza e tira as fotografias. Dentro da câmara, as esferas são expostas a um *LED* (Light-emitting diode) vermelho e um verde, que tanto excita os corantes internos que identificam a assinatura de cor de cada microesfera e a fluorescência informante da sua superfície. O *LED* vermelho é responsável pela classificação das microesferas. Outros filtros, CL1 e CL2, categorizam as *beads* com base na assinatura de cores e as coloca corretamente no mapa de microesferas, bem como descarta todos as duplicidades que possam existir. O *LED* verde com o o filtro RP1 produz a fluorescência que identifica os analitos capturados durante a análise. As microesferas lidas são desprezadas em um recipiente de resíduos, deixando espaço para a próxima amostra.

4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O software GraphPad Prism versão 8.0.1 foi utilizado para análise estatística e apresentação dos dados. O Teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para avaliação se a distribuição era normal ou não. As variáveis categóricas não paramétricas foram expressas em frequência absoluta e relativa e testadas quanto a diferenças estatisticamente significativas por meio do Teste Qui-quadrado de Pearson ou Teste de Fisher. As variáveis contínuas não paramétricas foram apresentadas como mediana e intervalo interquartil (IQR), os dados foram analisados pelo Teste Mann-Whitney U. Testes de correlação, rho de Sperman, foram utilizados entre interleucinas e dados laboratorias. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes sempre que o valor de p obtido fosse menor que 0.05 ($p < 0.05$).

5 Resultados

5.1. DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E LABORATORIAIS

Entre os 78 indivíduos incluídos no estudo, 40 (51,2%) foram a óbito. A maioria dos indivíduos eram homens (64,1%). No grupo masculino, a maior parte foi de casos fatais (70%; $p=0,396$) enquanto no feminino foi superior o número de recuperados (42,1%; $p=0,4497$) (Tabela 1).

A mediana de idade foi de 59 anos (IQR=22-97). O grupo de casos fatais apresentou uma mediana de 69,5 anos (IQR=22-97) e nos casos recuperados de 41 anos (IQR=22-82), respectivamente ($p=0,0001$) (Tabela 1).

Do total de casos, 83,3% eram provenientes de Fortaleza e o restante de Maracanaú, Madalena, Beberibe, Aracoiaba, Paraipaba, Itapajé, Tauá, Pacajus, Caucaia, Tururu, Pentecostes, Quixeramobim. A mediana de dias de internação foi de 12 dias (1-83). Para os casos de recuperados a mediana foi 14,5 dias, enquanto que no grupo de casos fatais foi de 10 dias (Tabela 1).

Dentre as comorbidades, a HAS foi a mais frequente (30,7%). Observou-se associação estatística significativa para o grupo de óbitos em indivíduos com AVC ($p = 0,0076$). Os indivíduos sem comorbidades representaram 41% do total de indivíduos, sendo 50% pertencente ao grupo de recuperados (Tabela 1).

A dosagem dos marcadores sanguíneos e contagem de células apresentaram os seguintes resultados: PCR (133,1 mg/L), Dímero-D (2,42 mg/L), leucócitos ($13,61 \times 10^3/\text{mm}^3$), neutrófilos ($12,23 \times 10^3/\text{mm}^3$) e linfócitos ($0,998 \times 10^3/\text{mm}^3$). Indivíduos que se recuperaram tiveram maior contagem de plaquetas ($274,5 \times 10^3/\text{mm}^3$) do que os casos fatais ($193,5 \times 10^3/\text{mm}^3$; $p=0,0063$) (Tabela 1).

Tabela 1. Características sociodemográficas, clínicas e laboratoriais de pacientes com diagnóstico de COVID-19 grave internados na UTI do IJF.

Características	Total (n=78)	Óbitos (n=40)	Altas (n=38)	P value
Homens*	50 (64.1%)	28 (70%)	22 (57.9%)	0.3961
Mulheres*	28 (35.9%)	12 (30%)	16 (42.1%)	0.4497
Idade**	59 (22- 97)	69.50 (22-97)	41 (22-82)	0.0001
Municípios*				
Fortaleza	65 (83,3%)	36 (90%)	29 (76,3%)	
Outros	13 (16,7%)	4 (10%)	9 (23,7%)	
Comorbidades**				
HAS	24 (30.7%)	14 (35%)	10 (26.3%)	0.4142
Obesidade/Sobrepeso	12 (15.4%)	5 (12.5%)	7 (18.4%)	0.5637
DM 1 e 2	15 (19.2%)	11 (27.5%)	4 (10.5%)	0.0707
Cardiopatias	13 (16.7%)	7 (17.5%)	6 (15.8 %)	0.7815
Nefropatias	9 (11.5%)	4 (10%)	5 (13.2%)	0.7389
AVC	6 (7.7%)	6 (15%)	0	0.0143
Ex-Fumantes	4 (5.1%)	3 (7.5%)	1 (2.6%)	0.3173
Ex-Etilistas	3 (3.8%)	3 (7.5%)	0	0.0833
Outras	9 (11.5%)	5 (12.5 %)	4 (10.5%)	0.7389
Sem Comorbidades	32 (41%)	13 (32.5%)	19 (50%)	0.2888
Dias Internação**	12 (1-83)	10 (1-67)	14.50 (3-83)	0.2422
PCR **	133.1 (0.7-515)	142.3 (0.7- 488.8)	109.7 (2.1-515)	0.3716
Dímero - D***	2,420 (0.23 - 33.01)	2,440 (0.56 - 25.02)	2,370 (0,23-33,01)	0.3257
Leucócitos**	13.615 (3.730-35.660)	14.140 (3.820-29.560)	13.050 (3.730-35.660)	0.5277
Neutrófilos**	12.235 (3.148-31.808)	12.551 (3.202-27.490)	10.718 (3.148-31.808)	0.3267
Linfócitos**	998 (231 - 4.478)	805 (306-2.874)	1.079 (231-4478)	0.0714
Monócitos**	533 (0-2.088)	452.5 (76-2.088)	554.5 (0-1.676)	0.1694
Plaquetas**	235.500 (48.000-564.000)	193.500 (48.000-511.000)	274.500 (68.000-564.000)	0.0063

* Frequência absoluta (relativa);**Mediana (IQR);*** n Fatais=32; n Recuperados=33. Teste Qui-quadrado de Pearson, Teste de Fisher, Teste Mann-Whitney U.

5.2. CITOCINAS

Algumas amostras apresentaram concentração de determinadas citocinas abaixo do limite inferior de quantificação, portanto não foram utilizadas nas análises estatísticas.

Apenas quatro das citocinas quantificadas tiveram diferença estatística significativa na comparação entre os desfechos óbitos e altas, IL-18 (p=0,009), GM-CSF (p=0,0187) IL-22 (p=0,473) e IL-23 (p=0,313). GM-CSF, IL-22 e IL-23 apresentaram níveis de quantificação em poucas amostras (n=28, n=19, n=8, respectivamente). Apesar de não apresentarem significância estatística, IFN-g (n=63), IL-10 (n=70) , IL-12p70 (n=57) e MCP-1 (n=75) tiveram níveis de concentração quantificáveis na maior parte das amostras (Tabela 2).

A concentração da IL-18 foi maior nos óbitos (139,2 pg/mL) em relação aos que receberam alta hospitalar (98,2 pg/mL) (Tabela 2). Na comparação da concentração entre

homens e mulheres, não houve diferença significativa ($p=0,2503$) (Gráfico 1). Além disso, esta foi a única citocina que apresentou níveis de concentração detectáveis em todas as amostras. A IL-23 também teve maior concentração nos óbitos (54,11 pg/mL). Já as citocinas, GM-CSF e IL-22 apresentaram maior concentração no grupo das altas (76,27 pg/mL e 168,8 pg/mL, respectivamente) (Tabela 2).

As variáveis idade ($p = 0,8249$), contagem de plaquetas ($p = 0,5546$), GM-CSF ($p = 0,2417$), IL-22 ($p = 0,2826$) e IL-23 ($p = 0,3268$) não apresentaram correlação com os níveis de IL-18 para ambos os desfechos (Tab. 3).

Gráfico 1. Comparação entre os grupos de homens (H; $n=50$) e mulheres (M; $n=28$) com a concentração de IL-18 ($p = 0,2503$). Teste de Mann Whitney U.

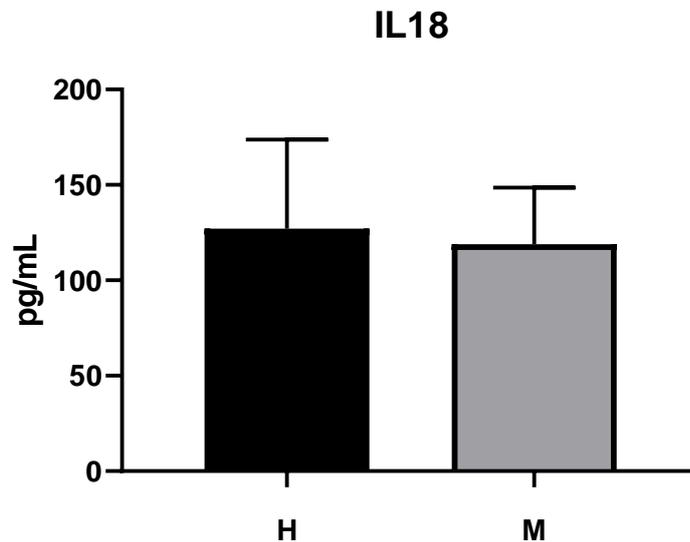


Tabela 2. Concentração das 20 citocinas analisadas nos desfechos Óbitos e Altas. Mediana (IQR).

Citocinas	Óbitos		Altas		P valor
	pg/ml	n**	pg/ml	n**	
GM-CSF	35.05 (18.39-209.4)	16	76.27 (18.39-531.6)	12	0.0187
IL-2	53.50 (9,804-87.23)	4	38.08 (20.74-90.98)	11	0.9700
IFN-a	0.8300 (0.173-3,272)	9	0.5820 (0.006-6.269)	9	0.4227
IL-4	6.067 (0.7330-68.54)	17	12.53 (0.7330-203.5)	14	0.1223
IFN-g	16.25 (0.7190-215.9)	37	14.80 (1,928-158.7)	26	0,6592
IL-5	10.54 (1,918-78.13)	20	21.45 (4,876-310.7)	18	0.1652
IL-6	165.3 (28.26-4,014.0)	21	202 (2,056-1,200.0)	16	0.6328
IL-9	41.64 (2.518-118.2)	21	20.07 (2.518-103.3)	15	0.4035
IL-10	9,630 (0.344-179.9)	38	7,458 (0.344-123.6)	32	0.3584
IL-12P70	1,062 (0.09-8,425)	33	0.8050 (0.09-30.91)	24	0.8690
IL-17A	3,395 (1,158-32)	30	7,329 (1,158-73.84)	20	0.0917
IL-13	7,456 (3.157-42.12)	20	11.78 (3.157-101.2)	14	0.2606
IL-18	139.2 (36.64-3,361.0)	40	98.28 (4.606-414.4)	38	0.009
IL-21	16.03 (3.220-547.1)	21	11.08 (0.2440-220.1)	15	0.8306
IL-22	81.28 (8.209-966.2)	12	168.8 (69.96-475.2)	7	0.0473
IL-23	54.11 (23.18- 85.04)	2	44.13 (14.16-271.1)	6	0.0313
IL-1b	12.28 (6,310-53.88)	10	12.41 (6,310-171.4)	12	0.3157
IL-27	26.10 (2047-197.9)	16	51.93 (2047-487.4)	14	0.1012
MCP-1	134.7 (23.33-1.854.0)	40	106.6 (5.886-1.973.0)	35	0.1863
TNF-a	17.80 (1.389-118.9)	25	20.96 (1.389-185.4)	20	0.8962

** n= número de amostras com quantidades detectáveis de citocina. Teste Mann Whitney U

Tabela 3. Correlação entre IL-18 e as variáveis idade, plaquetas, IL-22, IL-23 e GM-CSF

VARIÁVEIS	Idade	Plaquetas	IL-22	IL-23	GM-CSF
IL-18	r = 0,02545 p = 0,8249	r = 0,06793 p = 0,5546	r = 0,2599 p = 0,2826	r = 0,4048 p = 0,3268	r = 0,2288 p = 0,2417

Teste de Correlação ρ de Spearman. Valor de $p < 0,05$.

6. Discussão

Na COVID-19 coeficientes de mortalidade são impulsionadas, predominantemente, por indivíduos que evoluem para insuficiência respiratória grave e síndrome do desconforto respiratório agudo (FRANKE *et al.*, 2020). A combinação da imunopatologia com possíveis fatores de risco, como idade, sexo e presença de comorbidades pode estar associado ao desenvolvimento de COVID-19 grave (GAO *et al.*, 2020).

Estudos evidenciam que há diferença na progressão clínica da COVID-19 entre os sexos. A incidência, o desenvolvimento da forma grave e altas taxas de mortalidade são significativamente maiores em pessoas do sexo masculino (TAKAHASHI *et al.*, 2020). No estudo de Dorgham e *col.* (2021), 72,2% dos indivíduos internados em UTI eram do sexo masculino e entre os que evoluíram para o estado crítico, 83,3% também eram homens. O mesmo foi mostrado em um estudo paulista, onde 67,7% dos indivíduos infectados e internados com SARS-COV-2 eram homens, com 57% evoluindo para o óbito (DESIDÉRIO *et al.*, 2021). Nosso estudo corrobora com esses achados já que 64,1% dos indivíduos incluídos no estudo eram do sexo masculino, representando 70% do total de óbitos

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar essas diferenças, incluindo genética, respostas imunes, fatores hormonais, ambientais e culturais (FRAGA-SILVA *et al.*, 2021). Um estudo da década de 1960 de Butterworth e colaboradores, evidenciou a capacidade do sistema imunológico feminino de produzir maior quantidade de anticorpos em resposta a determinados patógenos. Tais dados podem estar relacionados à maior resistência feminina à doenças infecciosas, incluindo aquelas causadas por vírus respiratórios (FRAGA-SILVA *et al.*, 2021). Os hormônios sexuais, estrogênios e andrógenos, modulam diferentemente as respostas nos processos inflamatórios ativando receptores leucocitários específicos que vão influenciar positivamente ou negativamente na susceptibilidade a infecções (BUPP; JORGENSEN, 2018).

Dessa forma, estudos presumem que estes hormônios podem interferir no prognóstico diferenciado da COVID-19 entre homens e mulheres.

A população idosa possui um risco aumentado de infecção por SARS-COV-2, com apresentações atípicas e graves da doença, além de maiores taxas de mortalidade do que em pessoas mais jovens (FARSHBAFNADI *et al*, 2021). Tjan e colaboradores (2021) relataram que pacientes assintomáticos ou levemente sintomáticos foram significativamente mais jovens do que aqueles com doença grave. No presente estudo, indivíduos mais velhos apresentaram maior taxa de mortalidade com mediana de idade de 69,5 anos. Este dado vai ao encontro do relatado por Zhou *et al.* (2020) que apresentou uma mediana de idade para óbitos de 69 anos.

Os mecanismos associados à gravidade da doença em idosos com COVID-19 envolvem a superexpressão da ECA-2, distúrbios na regulação imunológica, diminuição dos esteróides sexuais, má nutrição, deficiência de vitamina D, alterações na microbiota intestinal, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, além de comorbidades associadas ao envelhecimento. Esses efeitos resultam em aumento da replicação do vírus e ativação da tempestade de citocinas, sendo este fator fundamental para desencadear processos hiperinflamatórios por vezes irreversíveis em indivíduos com mais idade (FARSHBAFNADI *et al*, 2021).

Indivíduos com comorbidades que afetam de forma significativa os vasos sanguíneos, como hipertensão, diabetes e AVC, costumam apresentar uma resposta imunológica disfuncional frente a infecções por patógenos o que contribui para a maior susceptibilidade a quadros graves e/ou fatais pela COVID-19 (BEACON *et al.*, 2020). Da mesma forma, agentes infecciosos também são considerados fatores de risco para o desenvolvimento de determinadas comorbidades.

Uma revisão sistemática por Kazemi *et al.* (2021) mostrou que a infecção por SARS-CoV-2 pode estar correlacionada com o AVC. Os supostos mecanismos que podem explicar essa relação entre AVC e COVID-19 incluem coagulopatias (especialmente trombofilia), aumento da expressão de ECA-2 em células do SNC e a interação com SARS-CoV-2, disfunção endotelial, microtrombose, hipóxia e lesão vascular, levando à ativação da cascata de citocinas inflamatórias. Klok *et al.* relataram que complicações trombóticas ocorreram em 31% dos pacientes com COVID-19 grave internados em UTI. Nosso estudo corrobora com esses achados ao mostrar que indivíduos com a forma grave da COVID-19 e que tiveram AVC apresentaram maior risco de morte do que aqueles sem comorbidades.

No estudo de Rees *et al.* (2020), o tempo médio de internação dos pacientes com COVID-19 foi maior nos hospitais chineses (4-53 dias) do que em outros países (4-21 dias).

Em UTI os dias de internação foram semelhantes entre todos os países (5-19 dias). No Brasil, um levantamento do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Institucional do Sistema Único de Saúde (PROADI-SUS) incluindo 50 hospitais públicos e privados, estimou o tempo médio de permanência para tratamento de COVID-19 em 11,6 dias. Da mesma forma, nosso estudo mostra uma mediana de 12 dias de internação.

Pacientes com pneumonia por COVID-19 apresentam anormalidades de coagulação, geralmente com trombocitopenia leve. Em média, os pacientes com doenças graves têm uma contagem de plaquetas menor do que aqueles com doença não grave (WOO; MILLER, 2020). A trombocitopenia na admissão em pacientes com COVID-19 foi associada a um aumento de mortalidade de 4,24 vezes risco (CHI *et al.*, 2020). Da mesma forma, nossos resultados mostraram menor contagem de plaquetas em indivíduos que foram à obito. Os mecanismos de trombocitopenia associada ao COVID-19 são variados e podem estar relacionados ao dano endotelial e à formação de agregados plaquetários nos pulmões, na supressão da medula na interação do vírus com megacariócitos e redução na síntese de novas plaquetas, além de ativar maior número de trombócitos pela formação de complexos antígeno-anticorpo do hospedeiro, permitindo sua rápida eliminação da circulação pelo sistema reticuloendotelial (WOO; MILLER, 2020).

A identificação de parâmetros laboratoriais capazes de identificar indivíduos com maior risco de desenvolverem forma grave ou ir à óbito, permitem um melhor manejo clínico e terapêutico nos ambientes hospitalares. No caso específico da COVID-19, os pacientes com doença grave e fatal apresentam contagem de leucócitos e neutrófilos significativamente aumentada, contagem diminuída de linfócitos e biomarcadores de inflamação e de coagulação, como PCR e Dímero-D, em concentrações elevadas quando comparadas aos grupos de doença não grave e recuperados (HENRY *et al.*, 2020). Nossos dados mostram resultados semelhantes com concentração acima dos valores de referência para Dímero-D e PCR e discretas leucocitose e linfopenia.

Uma resposta imune robusta durante a infecção por SARS-COV-2 é considerada essencial para a resolução da COVID-19. No entanto, uma falha ao erradicar o vírus leva a um estado inflamatório persistente com consequente descontrole na produção de citocinas (FARA *et al.*, 2020). Metabólitos lipídicos e citocinas, incluindo quimiocinas e fatores de crescimento, são os principais reguladores de função e diferenciação das células imunes e, por isso, uma desregulação desses fatores está associada à evolução das formas graves ou óbito (CHI *et al.*, 2020). Estudos recentes mostram que a identificação destes biomarcadores inflamatórios pode ser usado para estratificação de risco em pacientes hospitalizados com COVID-19

(MONSERRAT *et al.*, 2021). Batista *et al.* (2022) mostraram que a maioria dos participantes do estudo pertencentes ao grupo de casos graves apresentou alterações importantes na concentração das citocinas.

No presente estudo, os níveis de IL-18 foram maiores em pacientes que faleceram em comparação com pacientes que receberam alta. A concentração sérica de IL-18 quando correlacionada com outros marcadores inflamatórios pode ser um preditor de gravidade da infecção por COVID-19. Além disso, a IL-18 também está associada ao agravamento e mortalidade em outras doenças virais, como influenza e dengue (SATIS *et al.*, 2021).

A IL-18 é uma citocina pró-inflamatória da família da IL-1, processada em sua forma ativa pela caspase-1. Funcionalmente, regula as respostas Th1 e Th2, e sua produção aumentada pode levar a uma exacerbação estado inflamatório (VECCHIÉ *et al.* 2020). Em pacientes com COVID-19, a IL-18 foi estudada por seu papel como componente de inflamassomas inflamatórios (RODRIGUES *et al.*, 2020). Os inflamassomas são complexos proteicos citosólicos importantes na resposta imune inata contra padrões moleculares associados a patógenos. A partir da ativação de inflamassomas, citocinas pró-inflamatórias como como IL-1 β e IL-18 são ativados e liberados no meio extracelular, levando à piroptose (morte celular por lise) e inflamação. Quando esse processo está superativado, a inflamação exacerbada desencadeia o agravamento da doença. Estudos mostram que o inflamassoma NLRP3 (NOD-, LRR- e proteína contendo domínio de pirina 3) é altamente expressa em pacientes com COVID-19, sendo um potencial marcador de gravidade da doença (CHEON; KOO, 2021).

Juntamente com outras citocinas, o aumento da expressão de IL-18 contribui para a síndrome de ativação dos macrófagos (SAM), uma condição observada em várias doenças, inclusive autoimunes (VECCHIÉ *et al.* 2020). Estudos revelaram semelhanças na patogênese do COVID-19 e a SAM através da presença de monócitos hiperativados e maior recrutamento de macrófagos e neutrófilos no sangue de indivíduos com SRAG (CHEON; KOO, 2021).

Outros biomarcadores que mostraram relevância em nosso estudo, mas que não tiveram níveis quantificáveis em todas as amostras, foram GM-CSF, IL-22 e IL-23. GM-CSF é uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos, células T, fibroblastos, células endoteliais e células epiteliais e tumorais, com a maior parte da produção ocorrendo em locais inflamatórios. Os níveis de GM-CSF são baixos ou indetectável em condições normais. No entanto, qualquer gatilho imunológico pode aumentar rapidamente sua concentração (COUTINHO *et al.*, 2022).

O papel do GM-CSF depende do estágio da doença e a da sua concentração sérica. Geralmente, maior concentração é observada na fase inicial com uma diminuição progressiva

nas fases tardias. Níveis elevados foram encontrados no fluido broncoalveolar de pacientes com SARS em comparação com controles saudáveis (MATUTE-BELO *et al.*, 2000). Dessa forma, GM-CSF pode contribuir indiretamente para SRAG por auxiliar na supressão da apoptose de neutrófilos ou atuar na recuperação de pacientes ao promover a diferenciação e ativação de macrófagos alveolares que contribuem para a eliminação viral (BONAVENTURA *et al.*, 2020). Nossos dados apontaram uma concentração menor nos casos fatais, sugerindo que GM-CSF possa exercer um feedback positivo na resposta imune, quando ela ocorre de forma precoce e controlada.

A IL-22 tem atraído grande interesse nos últimos anos, tornando-a uma das citocinas mais bem estudadas da família da IL-10. Ao contrário da maioria das interleucinas, que regulam diretamente a função de células hematopoiéticas, o maior impacto da IL-22 é exclusivamente em fibroblastos e células epiteliais devido à expressão restrita de seus receptores nos rins, pulmões, fígado, pâncreas, trato gastrointestinal, pele e timo. Portanto, a IL-22 representa um dos principais canais de comunicação entre células de tecidos especializados e o sistema imunológico podendo assumir um efeito protetor ou pró-inflamatório a depender do estágio da doença (FANG *et al.*, 2022).

O efeito pró-inflamatório da IL-22 é evidenciado por sua capacidade de promover a expressão de quimiocinas e citocinas inflamatórias, como IL-1b, IL-17 e TNF- α . Em contrapartida, estudos demonstraram que a IL-22 pode reduzir a gravidade da pneumonia através da regulação imune, ativando as funções protetoras ou regenerativas do tecido (KUMAR *et al.*, 2013). Como o COVID-19 é um distúrbio respiratório com características patológicas e sintomas semelhantes a outras infecções graves por vírus pulmonares, é razoável especular que essa citocina também pode servir para limitar a gravidade desta doença (FANG *et al.*, 2022). Nossos dados corroboram com essas informações já que observamos uma concentração de IL-22 maior em indivíduos que se recuperaram.

A IL-23 induz a proliferação das células T helper 17 (Th17) e a diferenciação de células T naive no cluster TCD4+. Estudos recentes sugerem que Th17 pode estar envolvido em lesões graves nos processos infecciosos (WUANG and TRUONG, 2020). Segundo os dados no nosso estudo, a maior concentração da IL-23 nos indivíduos que foram a óbito, sugerem sua relação com doença grave. Os inibidores de IL-23, por meio de seus efeitos no Th17, podem desempenhar um papel na atenuação de citocinas pró-inflamatórias chaves, possivelmente resultando em uma manifestação mais branda da COVID-19 (JAHAI *et al.*, 2021).

Citocinas como IFN- γ , IL-10, IL-12p70, MCP-1 não apresentaram significância estatística na comparação entre os grupos de alta e óbitos no presente estudo, mas tiveram níveis

quantificáveis na maioria das amostras. O desfecho óbito foi o que mostrou maior concentração destas citocinas. O estudo de Monserrat *et al.* (2022) também tiveram grandes aumentos em IL-10 nos desfechos fatais. O trabalho de Ruan *et al.* (2020) mostra que pacientes graves da UTI tiveram maiores níveis de IL-10 e MCP-1.

Um estudo multicentrico demonstrou que níveis da interleucina-10 e a interleucina-12p70 em combinação com variáveis clínicas, na admissão hospitalar são os principais biomarcadores associados a um risco aumentado de progressão da doença em pacientes hipertensos com COVID-19. Além disso, o mesmo estudo mostrou que níveis de IL-10, IP-10, G-CSF, IFN- α 2, IL-1ra, IL-15, IL-1 α , IL-12 (p70), IL-2, IL-17A, GM-CSF, IL-8, IL-6, MCP-1, e a PCR foram maiores em pacientes graves do que os não graves (MOLL-BERNARDES *et al.*, 2021).

A IL-10 é uma citocina imunorreguladora liberada a partir de células apresentadoras de antígenos (APCs) com a principal função de limitar as respostas inflamatórias e regular diferenciação e proliferação de linfócitos T CD8 atuantes, principalmente, durante a resposta imune adaptativa. Na COVID-19 os níveis de IL-10 são aumentados na segunda semana após o início dos sintomas, indicando um esforço imunológico latente para controlar a cascata de citocinas (LU *et al.*, 2021). IL-12 é uma citocina heterodimérica composta pelas subunidades p35 e p40 que aumenta conexões entre as respostas imunes inata e adaptativa. Sua expressão é induzida por meio de um agente molecular associado ao patógeno em resposta à entrada no vírus na célula. A função de IL-12 p70 na COVID-19 necessita ser melhor estudada (MOLL-BERNARDES *et al.*, 2021).

Os IFN (tipos I, II, III) são citocinas centrais envolvidas na imunidade a bactérias e vírus. O tipo II, IFN- γ , é produzido por macrófagos, em resposta a infecções virais e/ou bacterianas intracelulares, e por células NK. Além disso, o IFN- γ é produzido por linfócitos T helper CD4 e linfócitos T citotóxicos CD8 durante a imunidade antígeno-específica. Na COVID-19, os níveis de IFN- γ aumentam proporcionalmente com a carga viral, sendo associado à doença grave devido à uma diminuição na contagem de linfócitos efetores e aumento da infiltração de neutrófilos nos alvéolos pulmonares (FARA *et al.*, 2020).

Uma diferença genética que prejudica a resposta imune do IFN- γ , resultando em sintomas incomuns e severidade, foi recentemente considerado relevante para o COVID-19. A análise funcional das proteínas do SARS-CoV-2 mostra que o vírus é vulnerável ao IFN- γ (HAYN *et al.*, 2021). Esses achados sugerem que o IFN- γ ou seus precursores, como IL-18, IL-12 ou IL-23, podem exercer um papel fundamental no prognóstico da COVID-19 (SCHOOLING *et al.*, 2022).

Pertencente à família das quimiocinas, a MCP-1 também conhecida como CCL2, possui papel vital no processo de inflamação, atraindo ou potencializando a expressão de outros fatores e células inflamatórias, como monócitos e macrófagos para o local da inflamação. O nível elevado de MCP-1 foi observado em pacientes com COVID-19 e provou ser um biomarcador associado à extremidade da doença junto com IP-10 (SINGH *et al.*, 2021).

Diferentemente de vários estudos sobre resposta imune e apresentação das citocinas em indivíduos que desenvolveram a forma grave da COVID-19, no presente estudo não foi possível mensurar as principais envolvidas no processo hiperinflamatório causado pela doença, como as IL-6, IL-1 β e TNF. Essa foi uma limitação importante da pesquisa e com causas variadas para esse desfecho. Primeiramente, as amostras deste estudo foram coletadas por profissionais da área da saúde que trabalhavam na UTI do referido hospital e que faziam os cuidados dos pacientes incluídos no estudo. Não houve uma padronização rigorosa de centrifugação e armazenamento destas amostras, principalmente com relação ao controle da temperatura durante o transporte do hospital até o laboratório de pesquisa. Sabendo que as citocinas tem uma degradação rápida e são sensíveis à mudanças de temperatura, podemos considerar isso como um fator prejudicial para as nossas análises.

Outra questão de grande importância diz respeito ao método analítico escolhido, o Multiplex por Luminex. Apesar da técnica ser bem fundamentada e oferecer resultados altamente reprodutíveis, confiáveis e tão precisos quanto o ELISA, vários fatores podem limitar a disponibilidade e utilidade da técnica. São facilmente sujeitos a variações devido ao fabricante, número do lote e a execução do ensaio. Adicionalmente, a presença de autoanticorpos humanos em algumas amostras biológicas pode causar confusão no equipamento durante a medição de citocinas devido ligações inespecíficas (KHALIFIAN *et al.*, 2015).

Além disso, sabe-se que pacientes internados em UTI fazem uso de uma vasta quantidade de medicamentos, principalmente corticóides. Essas drogas são capazes de modular as respostas imunológicas e com isso alterar a concentração de moléculas inflamatórias no sangue.

O presente estudo demonstra importância no cenário de pesquisas sobre a COVID-19, pois nossos indivíduos foram avaliados no momento inicial da pandemia, em um contexto em que não havia vacinas disponíveis e nem tratamentos padrões protocolados. O conhecimento sobre resposta imunológica ainda era escasso. A relação entre a IL-18 e COVID-19 era pouco relatada em outras pesquisas, sendo este estudo um dos poucos a focar nesta citocina.

Dessa forma, os dados obtidos no nesta pesquisa podem sugerir uma associação significativa entre os níveis alterados de citocina e o descontrole do processo inflamatório quando comparamos os desfechos de recuperados e fatais. Fatores associados à idade, sexo e comorbidades podem contribuir para o mau prognóstico em pacientes críticos com COVID-19.

7. Conclusão

Os indivíduos do nosso estudo foram majoritariamente de casos fatais. O sexo masculino foi predominante, sendo que a maioria foi a óbito. A mediana de idade seguiu o padrão apresentado por outros estudos recentes sobre a COVID-19, onde os indivíduos que foram à óbito apresentaram maior mediana do que aqueles que se recuperaram.

Os dados sociodemográficos apresentaram maior predominância dos indivíduos internados provenientes de Fortaleza. A mediana dos dias de internação é semelhante aos relatados em outros estudos sendo que nos casos recuperados foi maior do que nos que foram a óbito.

Entre as comorbidades observamos uma maior predominância de indivíduos com HAS. Metade dos indivíduos que se recuperaram não apresentavam nenhuma comorbidade prévia. Encontramos associação estatística significativa entre os pacientes com AVC e os sem comorbidades para o grupo de óbitos.

Na dosagem dos marcadores sanguíneos tivemos os resultados de PCR e Dímero-D acima dos valores de referência para a população total. Com relação à contagem das células sanguíneas, observamos discreta leucocitose, neutrofilia e moderada linfopenia também no **n** total. Indivíduos que se recuperaram apresentaram maior contagem de plaquetas do que os casos fatais.

Determinadas citocinas apresentaram concentração abaixo do limite inferior de quantificação em algumas amostras e por isso não foram utilizadas nas análises estatísticas. Apenas as IL-18, GM-CSF, IL-22 e IL-23 mostraram significância estatística. A IL-23 também teve maior concentração nos óbitos do que nas altas, enquanto GM-CSF e IL-22 apresentaram maior concentração no grupo das altas do que no de óbitos.

A citocina de maior destaque foi a IL-18, pois além de apresentar diferença estatística significativa entre os desfechos também teve níveis quantificáveis em todas as amostras. Sua concentração foi maior nos casos de óbitos quando comparado aos que receberam alta hospitalar. Na análise de correlação entre os níveis de IL-18 com idade, sexo, contagem de plaquetas, contagem de linfócitos, GM-CSF, IL-22 e IL-23 não houve significância estatística.

Mesmo não apresentando significância estatística, IFN-g, IL-10, IL-12p70 e MCP-1 tiveram níveis de concentração quantificáveis na maior parte das amostras.

8. Considerações Finais

Em comparação com SARS e MERS, o SARS-CoV-2 apresenta forte infecciosidade, mas menos virulência em termos de gravidade da doença e taxas de mortalidade mais altas em determinadas faixas etárias. No entanto, as altas e rápidas taxas de transmissão causadas em apenas algumas semanas, fez do COVID-19 mais danoso em termos de saúde, bem-estar, vida social e impactos econômicos globais. (HOKELLO et al, 2020)

A flexibilidade e as mutações constantes no genoma do SARS-CoV-2 permitiu sua adaptação a diferentes hospedeiros através de estratégias de escape na resposta imune. Essa pode ser a explicação de sua rápida dispersão global (BORGES *et al.* 2020). Entender os determinantes virais e do hospedeiro são decisivos no conhecimento de quais indivíduos podem desenvolver doença leve ou grave.

Os sintomas clínicos e as complicações geradas pela doença são resultados de respostas hiperinflamatórias provenientes da desregulação imunológica do indivíduo infectado pelo SARS-CoV-2. Por isso, a avaliação das citocinas e outros biomarcadores de forma precoce em amostras de indivíduos que desenvolveram a COVID-19 demonstra importância na progressão da doença, principalmente nos casos graves e críticos, podendo servir como alvo terapêutico ou auxiliando na escolha da melhor intervenção.

O SARS-CoV-2 requer um esforço eficaz e global entre pesquisadores, governos, epidemiologistas, virologistas, autoridades e profissionais de saúde. Além disso, a sociedade como um todo também é responsável pelo controle da doença quando se cumpre as medidas protetivas indicadas e validadas, como cumprir as campanhas de vacinação.

REFERÊNCIAS

- ASSELAH, Tarik; DURANTEL, David; PASMANT, Eric; *et al.* COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development. **Journal of Hepatology**, v. 74, n. 1, p. 168–184, 2021. doi: 10.1016/j.jhep.2020.09.031.PMID: 33038433; PMCID: PMC7543767.
- AZKUR, Ahmet Kursat; AKDIS, Mübeccel; AZKUR, Dilek; *et al.* Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. **Allergy**, v. 75, n. 7, p. 1564–1581, 2020. PMCID: PMC7272948. DOI: 10.1111/all.14364
- BATISTA, Fabiani de M.; PUGA, Marco A.M.; SILVA, Patrícia V. *et al.* Serum biomarkers associated with SARS-CoV-2 severity. **Scientific Report 12**, 15999 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20062-5>
- BEACON, Tasnim H.; SU, Ruey-Chyi; LAKOWSKI, Ted M. *et al.* SARS-CoV-2 multifaceted interaction with the human host. Part II: Innate immunity response, immunopathology, and epigenetics. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**. 2020 Nov;72(11):2331-2354. doi: 10.1002/iub.2379. Epub 2020 Sep 16. PMID: 32936531.
- BHARDWAJ, Asha; SAPRA, Leena; SAINI, Chaman; *et al.* COVID-19: Immunology, Immunopathogenesis and Potential Therapies. **International Reviews of Immunology**, v. 41, n. 2, p. 171–206, 2022. doi: 10.1080/08830185.2021.1883600.
- BOECHAT, J.L.; CHORA, I.; MORAIS, A.; *et al.* The immune response to SARS-CoV-2 and COVID-19 immunopathology – Current perspectives. **Pulmonology**, v. 27, n. 5, p. 423–437, 2021. doi: 10.1016/j.pulmoe.2021.03.008.
- BONAVENTURA, Aldo; VECCHIÉ, Alessandra; WANG, Tisha S. *et al.* Targeting GM-CSF in COVID-19 Pneumonia: Rationale and Strategies. **Frontier Immunology**. 2020 Jul 3;11:1625. doi: 10.3389/fimmu.2020.01625. PMID: 32719685; PMCID: PMC7348297.
- BORGES, A. A.; SUZUKAWA, A. A.; ZANLUCA, C.; SANTOS, C. N. D. dos. SARS-CoV-2: origem, estrutura, morfogênese e transmissão. In: BARRAL-NETTO, M.; BARRETO, M. L.; PINTO JUNIOR, E. P.; ARAGÃO, E. (org.). Construção de conhecimento no curso da pandemia de COVID-19: aspectos biomédicos, clínico-assistenciais, epidemiológicos e sociais. Salvador: Edufba, 2020. v. 1. DOI: doi.org/10.9771/9786556300443.002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica: Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional pela Doença pelo Coronavírus 2019 – COVID-19. Brasília. 20 de janeiro de 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/publicacoes-tecnicas/guias-e-planos/guia-de-vigilancia-epidemiologica-covid-19/view>
- BRASIL. Ministério da Saúde. FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. Observatório COVID-19. Dashboard da rede genômica. Vigilância Genômica do SARS-CoV2 no Brasil. Brasília. 30 de novembro de 2022. Disponível em: <https://www.genomahcov.fiocruz.br/dashboard-pt/>

BRASIL. Ministério da Saúde. Painel Coronavírus Brasil. Brasília. 30 de novembro de 2022. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br/>>

BRASIL. Ministério da Saúde. Relatório de Recomendação: Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas. Diretrizes Brasileiras para Tratamento Hospitalar do Paciente com COVID-19 – Capítulo 2: Tratamento Medicamentoso. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos estratégicos em Saúde. Departamento de gestão e incorporação de tecnologias em saúde. Coordenação-geral de gestão de protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas. Dezembro de 2022. Nº 798.

CEARÁ. Governo do Estado do Ceará. Secretaria Estadual de Saúde do Ceará. Boletim Epidemiológico COVID-19 nº19. 09 de setembro 2022. Brasil. Disponível em: <<https://www.saude.ce.gov.br/download/covid-19/>>

BUPP, Mellanie R. G.; JORGENSEN, Trine N. Androgen-Induced Immunosuppression. **Frontier Immunology**. 2018 Apr 17;9:794. doi: 10.3389/fimmu.2018.00794. PMID: 29755457; PMCID: PMC5932344.

BUTTERWORTH, Michael; MCCLELLAN, Barbara; ALLANSMITH, Mathea. Influence of sex in immunoglobulin levels. **Nature** (1967) 214:1224–5. doi: 10.1038/2141224a0.

CHEON, So Y.; KOO, Bon-Nyeo. Inflammatory Response in COVID-19 Patients Resulting from the Interaction of the Inflammasome and SARS-CoV-2. **Internacional Journal Molecular Science**. 2021 Jul 24;22(15):7914. doi: 10.3390/ijms22157914. PMID: 34360684; PMCID: PMC8348456.

CHEN, Yu; LIU, Qianyun; GUO, Deyin. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 4, p. 418–423. doi: 10.1002/jmv.25681. Epub 2020 Feb 7.

CHI, Ying; GE, Yiyue; WU, Bin *et al.* Serum Cytokine and Chemokine Profile in Relation to the Severity of Coronavirus Disease 2019 in China. **Journal Infectious Diseases**. 2020 Aug 4;222(5):746-754. doi: 10.1093/infdis/jiaa363. PMID: 32563194; PMCID: PMC7337752.

CUI, Jie; LI, Fang; SHI, Zheng-Li. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181–192, 2019. doi: 10.1038/s41579-018-0118-9.

DEL VALLE, Diane M.; KIM-SCHULZE, Seunghee; HUANG, Hsin-Hui; *et al.* An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. **Nature Medicine**, v. 26, n. 10, p. 1636–1643, 2020. doi: 10.1038/s41591-020-1051-9.

DESIDERIO, Vagner L.; FABIO, Vânia; CARNIO, Evelin C. *et al.* (2021). Variáveis associadas ao desfecho clínico de pacientes hospitalizados por COVID-19. **Revista De Medicina**, 100(5), 431-441. USP-SP. <https://doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v100i5p431-441>

DHAMA, Kuldeep; KHAN, Sharun; TIWARI, Ruchi; *et al.* Coronavirus Disease 2019–COVID-19. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 4, p. e00028-20, 2020. doi: 10.1128/CMR.00028-20.

- DORGHAM, Karim; QUENTRIC, Paul; GÖKKAYA, Mehmet. Distinct cytokine profiles associated with COVID-19 severity and mortality. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 2021 Jun;147(6):2098-2107. doi: 10.1016/j.jaci.2021.03.047. Epub 2021 Apr 22. PMID: 33894209; PMCID: PMC8061091.
- FARA, Antonella; MITREV, Zan; ROSALIA, Rodney Alexander; *et al.* Cytokine storm and COVID-19: a chronicle of pro-inflammatory cytokines. **Open Biology**, v. 10, n. 9, p. 200160, 2020. doi: 10.1098/rsob.200160.
- FARSHBAFNADI, Melina; ZONOUI, Sara K.; SABAHI, Mohammadmahdi *et al.* Aging & COVID-19 susceptibility, disease severity, and clinical outcomes: The role of entangled risk factors. **Experimental Gerontology**. **ELSEVIER**. 2021 Oct 15; 154:111507. doi: 10.1016/j.exger.2021.111507. Epub 2021 Aug 3. PMID: 34352287; PMCID: PMC8329427.
- FEHR, Anthony R.; PERLMAN, Stanley. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *In*: MAIER, Helena Jane; BICKERTON, Erica; BRITTON, Paul (Orgs.). **Coronaviruses**. New York, NY: Springer New York, 2015, v. 1282, p. 1–23. doi: 0.1007/978-1-4939-2438-7_1
- FRAGA-SILVA, Thais F.C.; MARUYAMA, Sandra R.; SORGI, Carlos A., *et al.* COVID-19: Integrating the Complexity of Systemic and Pulmonary Immunopathology to Identify Biomarkers for Different Outcomes. **Frontier Immunology**. 2021 Jan 29;11:599736. doi: 10.3389/fimmu.2020.599736. PMID: 33584667; PMCID: PMC7878380.
- FRANKE, Lude; BOEZEN, Marike H.; DEELEN, Patrick. The Severe Covid-19 GWAS Group. Genomewide association study of severe Covid-19 with respiratory failure. **New England Journal Medicine**. 2020; 383:1522-34. DOI: 10.1056/NEJMoa2020283
- GAO, Ya-Dong; DING, Mei; DONG Xiang; *et al.* Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: A review. **Allergy**. 2021 Feb;76(2):428-455. doi: 10.1111/all.14657. Epub 2020 Dec 4. PMID: 33185910.
- GRÄF, Tiago; BELLO, Gonzalo; NAVECA, Felipe G. *et al.* Phylogenetic-based inference reveals distinct transmission dynamics of SARS-CoV-2 lineages Gamma and P.2 in Brazil. **iScience**, v. 25, n. 4, p. 104156, 2022. doi: 10.1016/j.isci.2022.104156.
- GUAN, Wei-jie; NI, Zheng-yi; HU, Yu; *et al.* Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 18, p. 1708–1720, 2020. doi: 10.1056/NEJMoa2002032.
- HAYN M *et al.* Systematic functional analysis of SARS-CoV-2 proteins uncovers viral innate immune antagonists and remaining vulnerabilities. **Cell Reports** 35, 109126. 2021. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109126.
- HE, Xi; LAU, Eric H. Y.; WU, Peng; *et al.* Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. 5, p. 672–675, 2020. doi: 10.1038/s41591-020-0869-5
- HELMY, Yosra A.; FAWZY, Mohamed; ELASWAD, Ahmed; *et al.* The COVID-19 Pandemic: A Comprehensive Review of Taxonomy, Genetics, Epidemiology, Diagnosis,

Treatment, and Control. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 4, p. 1225, 2020. doi: 10.3390/jcm9041225.

HENRY, Brandon M.; DE OLIVEIRA, Maria Helena S.; BENOIT, Stefanie *et al.* Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. **Clin Chem Lab Med**. 2020 Jun 25;58(7):1021-1028. doi: 10.1515/cclm-2020-0369. PMID: 32286245.

HOFFMANN, Markus; KLEINE-WEBER, Hannah; PÖHLMANN, Stefan. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. **Molecular Cell**, v. 78, n. 4, p. 779-784.e5, 2020. doi: 10.1016/j.molcel.2020.04.022

HOFFMANN, Markus; KLEINE-WEBER, Hannah; SCHROEDER, Simon; *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271-280.e8, 2020. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.

HOKELLO, Joseph; SHARMA, A. L.; SHUKLA, Girish C.; *et al.* A narrative review on the basic and clinical aspects of the novel SARS-CoV-2, the etiologic agent of COVID-19. **Annals of Translational Medicine**, v. 8, n. 24, p. 1686–1686, 2020. doi: 10.21037/atm-20-5272.

HUANG, Chaolin; WANG, Yeming; LI, Xingwang; *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, 2020. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5

IntegraSUS Saúde Digital. LACEN-CE. COVEP/SEVIR/SESA-CE. Disponível em: <https://integrasus.saude.ce.gov.br/#/indicadores/indicadores-coronavirus/cenario-epidemiologico-covid-19>- Acesso em: 10/04/2023.

JAHAJ, Edison; VASSILIOU, Alice G., KESKINIDOU, Chrysi *et al.* Evaluating the Role of the Interleukin-23/17 Axis in Critically Ill COVID-19 Patients. **Journal of Personalized Medicine**. 2021;11(9):891. Published 2021 Sep 7. doi:10.3390/jpm11090891

JAMAL, Muhammad; BANGASH, Hina Iqbal; HABIBA, Maria; *et al.* Immune dysregulation and system pathology in COVID-19. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 918–936, 2021. doi: 10.1080/21505594.2021.1898790

JONES, David L.; BALUJA, Marcos Quintela; GRAHAM, David W.; *et al.* Shedding of SARS-CoV-2 in feces and urine and its potential role in person-to-person transmission and the environment-based spread of COVID-19. **Science of The Total Environment**, v. 749, p. 141364, 2020. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.

KAMPS, Bernd S.; HOFFMANN, Christian. COVID Reference. 2020/2. Steinhäuser Verlag. 07 de abril de 2020. ISBN: 978-3-942687-40-9. Disponível em: <https://amedeo.com/CovidReference06.pdf>

KAMPS, Bernd S.; HOFFMANN, Christian. COVID Reference. 6ª edição. Steinhäuser Verlag. 2021/6. 13 de janeiro de 2021. ISBN: 978-3-942687-53-9. Disponível em: <<https://amedeo.com/CovidReference06.pdf>>. Acesso em: 29 de outubro de 2022.

MONSERRAT, Jorge; ASUNSOLO, Angel; GÓMEZ-LAHOZ, Ana *et al.* Impact of the Innate Inflammatory Response on ICU Admission and Death in Hospitalized Patients with COVID-19. **Biomedicines**. 2021 Nov 12;9(11):1675. doi: 10.3390/biomedicines9111675. PMID: 34829906; PMCID: PMC8615389.

MONSERRAT, Jorge; GÓMEZ-LAHOZ, Ana; ORTEGA, Miguel A. *et al.* On Behalf Of The Covid-Hupa Group. Role of Innate and Adaptive Cytokines in the Survival of COVID-19 Patients. *Int J Mol Sci*. 2022 Sep 7;23(18):10344. doi: 10.3390/ijms231810344. PMID: 36142255; PMCID: PMC9499609.

MORAWSKA, Lidia; MILTON, Donald K. It Is Time to Address Airborne Transmission of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Clinical Infectious Diseases**, p. ciaa939, 2020. doi: 10.1093/cid/ciaa939.

OPAS. Organização Pan Americana da Saúde. OMS. Organização Mundial da Saúde. Folha Informativa sobre COVID-19. 2021. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/covid19>>.

LÁZARO, Ana P. P.; ALBUQUERQUE, Polianna L.M.M.; MENESES, Gdayllon M. *et al.* Critically ill covid-19 patients in northeast brazil: mortality predictors during the first and second waves according to saps 3. **Kidney International Reports**, v. 7, n. 2, p. S365–S366, 2022. doi: 10.1093/trstmh/trac046.

REES, Eleanor M.; NIGHTINGALE, Emily S.; JAFARI, Yalda *et al.* COVID-19 length of hospital stay: a systematic review and data synthesis. **BMC Med** 18, 270 (2020). doi: 10.1186/s12916-020-01726-3.

REN, Li-Li; WANG, Ye-Ming; WU, Zhi-Qiang; *et al.* Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. **Chinese Medical Journal**, v. 133, n. 9, p. 1015–1024, 2020. doi: 10.1186/s12916-020-01726-3.

REN, Yujie; SHU, Ting; WU, Di; *et al.* The ORF3a protein of SARS-CoV-2 induces apoptosis in cells. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 17, n. 8, p. 881–883, 2020. doi: 10.1038/s41423-020-0485-9

RODRIGUES, Tamara S.; SÁ, Keyla S.G.de; ISHIMOTO, Adriene Y. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. **The Journal of Experimental Medicine**. 2021 Mar 1;218(3):e20201707. doi: 10.1084/jem.20201707. PMID: 33231615; PMCID: PMC7684031.

RUAN, Qiurong; YANG, Kun; WANG, Wenxia *et al.* Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. **Intensive Care Medicine**. 2020 May;46(5):846-848. doi: 10.1007/s00134-020-05991-x. Epub 2020 Mar 3. Erratum in: *Intensive Care Med*. 2020 Apr 6; PMID: 32125452; PMCID: PMC7080116.

SATIŞ, Hasan; ÖZGER Hasan S.; YILDIZ, Pinar A. *et al.* Prognostic value of interleukin-18 and its association with other inflammatory markers and disease severity in COVID-19. **Cytokine**. 2021 Jan;137:155302. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155302. Epub 2020 Sep 29. PMID: 33002740; PMCID: PMC7522034.

SCHOOLING, Mary C.; LI, Miaosi.; YEUNG, Shiu L. A. Interleukin-18 and COVID-19. *Epidemiol Infect.* 2021 Dec 16;150:e14. doi: 10.1017/S0950268821002636. PMID: 34911594; PMCID: PMC8755530.

SETHURAMAN, Nandini; JEREMIAH, Sundararaj Stanleyraj; RYO, Akihide. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA*, v. 323, n. 22, p. 2249, 2020. doi: 10.1001/jama.2020.8259.

SINGH, Sanjiv; ANSHITA, Dixit; RAVICHANDIRAN, Valayutham. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *Int Immunopharmacol.* 2021 Dec;101(Pt B):107598. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107598. Epub 2021 May 20. PMID: 34233864; PMCID: PMC8135227.

SOUZA, Pedro F.N.; MESQUITA, Felipe P.; AMARAL, Jackson L.; *et al.* The human pandemic coronaviruses on the show: The spike glycoprotein as the main actor in the coronaviruses play. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 179, p. 1–19, 2021. doi: 10.1016/j.ijbiomac.

SOUZA, William M. de; BUSS, Lewis F.; CANDIDO, Darlan da S. *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of the COVID-19 epidemic in Brazil. *Nature Human Behaviour*, v. 4, n. 8, p. 856–865, 2020. doi: 10.1038/s41562-020-0928-4

TJAN, Lydia H.; FURUKAWA, Koichi; NAGANO, Tatsuya *et al.* Early differences in cytokine production by severity of coronavirus disease 2019. *J. The Journal Infectious Diseases.* 223(7), 1145–1149 (2021). doi: 10.1093/infdis/jiab005

TAY, Matthew Z.; POH, Chek M.; RÉNIA, Laurent *et al.* The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology*, v. 20, n. 6, p. 363–374, 2020. doi: 10.1038/s41577-020-0311-8.

TO, Kelvin K-W.; SRIDHAR, Siddharth; CHIU, Kelvin H-Y. *et al.* Lessons learned 1 year after SARS-CoV-2 emergence leading to COVID-19 pandemic. *Emerging Microbes & Infections*, v. 10, n. 1, p. 507–535, 2021. doi: 10.1080/22221751.2021.1898291.

TO, Kelvin K-W.; TSANG, Owen T-Y.; LEUNG, W-S. *et al.* Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 20, n. 5, p. 565–574, 2020. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30196-1.

VECCHIÉ, Alessandra; BONAVENTURA, Aldo; TOLDO, Stefano *et al.* IL-18 and infections: Is there a role for targeted therapies? *Journal of Cellular Physiology.* 2021 Mar;236(3):1638-1657. doi: 10.1002/jcp.30008. Epub 2020 Aug 13. PMID: 32794180.

VOLOCH, Carolina M.; FRANCISCO, Ronaldo da S.; ALMEIDA, Luiz G. P. *et al.* Genomic Characterization of a Novel SARS-CoV-2 Lineage from Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Virology*, v. 95, n. 10, p. e00119-21, 2021. doi: 10.1128/JVI.00119-21.

WALKER, Patrick G. T.; WHITTAKER, Charles; WATSON, Oliver J. *et al.* The impact of COVID-19 and strategies for mitigation and suppression in low- and middle-income countries. *Science*, v. 369, n. 6502, p. 413–422, 2020. doi: 10.1126/science.abc0035

WANG, Catherine J.; TRUONG, Allison. K. (2020). COVID-19 infection on IL-23 inhibition. **Dermatologic Therapy**. doi:10.1111/dth.13893.

WANG, Wen; LIN, Xian-Dan; GUO, Wen-Ping; *et al.* Discovery, diversity and evolution of novel coronaviruses sampled from rodents in China. **Virology**, v. 474, p. 19–27, 2015. doi: 10.1016/j.virol.2014.10.017.

WOOL, Geoffrey D.; MILLER, Jonathan L. The Impact of COVID-19 Disease on Platelets and Coagulation. **Pathobiology**. 2020;88(1):15-27. doi: 10.1159/000512007. Epub 2020 Oct 13. PMID: 33049751; PMCID: PMC7649697.

XU, Zhe; SHI, Lei; WANG, Yijin; *et al.* Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 4, p. 420–422, 2020. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X.

YOUNG, Barnaby E; FONG, Siew-Wai; CHAN, Yi-Hao; *et al.* Effects of a major deletion in the SARS-CoV-2 genome on the severity of infection and the inflammatory response: an observational cohort study. **The Lancet**, v. 396, n. 10251, p. 603–611, 2020. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31757-8.

YUEN, Chun-Kit; LAM, Joy-Yan; WONG, Wan-Man; *et al.* SARS-CoV-2 nsp13, nsp14, nsp15 and orf6 function as potent interferon antagonists. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 1418–1428, 2020. doi: 10.1080/22221751.2020.1780953

ZANZA, Christian; ROMENSKAYA, Tatsiana; MANETTI, Alice C. *et al.* Cytokine Storm in COVID-19: Immunopathogenesis and Therapy. **Medicina**, v. 58, n. 2, p. 144, 2022. doi: 10.3390/medicina58020144

ZHOU, Peng; YANG, Xing-Lou; WANG, Xian-Guang; *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270–273, 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7

ZHOU, Fei; YU, Ting; DU, Ronghui *et al.* Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **Lancet**. 2020 Mar 28;395(10229):1054-1062. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3. Epub 2020 Mar 11. Erratum in: **Lancet**. 2020 Mar 28;395(10229):1038. Erratum in: **Lancet**. 2020 Mar 28;395(10229):1038. PMID: 32171076; PMCID: PMC7270627.

Correction for Zhang *et al.*, Identifying airborne transmission as the dominant route for the spread of COVID-19. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 41, p. 25942–25943, 2020. doi: 10.1073/pnas.2018637117.

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFC

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 / PROPEQ-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

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 ressuspensas 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 **CEP:** 60.430-275
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8344 **E-mail:** comepe@ufc.br

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 Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

CEP: 60.430-275

E-mail: comope@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 YAOCHITE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_covid.pdf	14/09/2020 09:23:07	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Brochura Pesquisa	Brochura.pdf	14/09/2020 09:22:33	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Folha de Rosto	rosto.pdf	05/08/2020 07:45:10	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DACT.pdf	05/08/2020 07:43:18	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Declaração de Pesquisadores	participantes.pdf	05/08/2020 07:34:01	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Outros	questionario_covid.pdf	10/07/2020 16:54:57	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Outros	carta_propesq.pdf	10/07/2020 16:54:38	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Orçamento	orcamento_covid.pdf	10/07/2020 16:52:24	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_covid.pdf	10/07/2020 16:51:49	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	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: BRASÍLIA

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 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".

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 imunossupressores,
- (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)33315-5877 **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 punccionada 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: BRASILIA

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: BRASILIA

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: BRASILIA

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 INTERNACIONAL

Short Communication

For reprint orders, please contact:
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^{‡,1}, Caroline N Oliveira^{‡,1}, Polianna LMM Albuquerque^{2,3}, Sandra MB

Mota^{1,2}, Gdayllon C Meneses¹ , Alice MC Martins⁴, Geraldo BS Junior^{2,3}, Marco AF

Clementino¹, Raffaella NDG Gondim¹, Alexandre Havt¹, Luciano PG Cavalcanti¹ & Juliana NU

Yaochite^{*,4} 

¹School of Medicine, Federal University of Ceara, Fortaleza, Ceara, 60430-160, Brazil

²Dr. Jose Frota Institute, Fortaleza, Ceara, 60025-061, Brazil ³University of Fortaleza, Fortaleza, Ceara, 60811-905, Brazil

⁴Faculty of Pharmacy, Dentistry & Nursing, Federal University of Ceara, Fortaleza, Ceara, 60430-370, Brazil

*Author for correspondence: ueda.juliana@gmail.com

[‡]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

As of 28 February 2022, more than 444 million confirmed cases of COVID-19, caused by the SARS-CoV-2 virus, and more than 6 million deaths had occurred, according to data from the World Health Organization COVID-19 Dashboard. It is now the most severe pandemic of the 21st century. Since the first cases were reported in December 2019, an attempt has been made to understand how the disease develops and which factors are associated with the broad spectrum of responses and outcomes of those infected [1].

The immune system plays a central role in determining the course of viral infections. Unregulated inflammatory response, whether insufficient or exacerbated, triggers a lower capacity to resolve the disease, leading to harmful effects on the body. This unregulated inflammation is called cytokine storm and is characterized by exacerbated production of cytokines from activated macrophages, dendritic cells, neutrophils, monocytes, NK cells, T and B lymphocytes and endothelial and epithelial cells [2]. IL-18 belongs to the IL-1 family and is the most crucial proinflammatory cytokine produced by macrophages at the beginning of the inflammatory response. It is responsible for the regulation of both T-helper response 1 (Th1) and 2 (Th2), in addition to being associated with the exacerbation of inflammation and tissue damage [3,4].

Investigating biomarkers that guide the prognosis of the SARS-CoV-2 is crucial because such knowledge would help in early and aggressive patient therapy [5]. This cross-sectional study aimed

to evaluate serum markers in unvaccinated patients admitted to the intensive care unit (ICU) at a reference hospital for COVID-19 in Fortaleza, northeastern Brazil, in 2020–21.

2 Methods

Study setting & patient selection

This cross-sectional study was conducted at the ICU of Dr Jose Frota Institute (IJF), a reference hospital for COVID-19, in Fortaleza, Brazil, from June to August 2020 and January to February 2021. The reported hospital was the primary reference in assisting COVID-19 patients requiring ICU. All patients ($n = 78$) were from the state of Ceara, and most from the capital city of Fortaleza ($n = 65$). All patients included in this study were admitted to the ICU, tested positive for SARS-CoV-2 infection and had not been vaccinated. The main factor considered to admit the patient to the ICU was the severity according to the Simplified Acute Physiology Score 3 [6] and the need for invasive support such as vasoactive drugs and/or mechanical ventilation. Almost all patients were admitted on the 8–10th day after symptom onset. Samples were collected upon admission after obtaining consent from the patients or their families.

Diagnosis was performed by a rapid test based on antigen detection or by detection of viral RNA from nasopharyngeal swabs using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The serum samples were collected for each patient on the first day of hospital admission in tubes without anticoagulants. Samples were centrifuged, aliquoted and stored in an ultra freezer at -80°C until analysis. Quantification of serum inflammatory biomarkers GM-CSF, MCP-1, TNF- α , IFN- α and IFN- γ , and IL-1 β , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-18, IL-2, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-4, IL-5, IL-6 and IL-9 was performed using a custom kit for 20 cytokines named Human ProcartaPlex Multiplex Immunoassay (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). The measurement was performed using the MAGPIX System (Merck, MA, USA) based on Luminex xMAP technology, according to the manufacturer's instructions.

Inclusion criteria

The eligibility criteria of the study were age ≥ 18 years; admission to ICU; confirmatory laboratory tests for the presence of SARS-COV-2 (RT-PCR and/or rapid antigen test) and manifestation of severe acute respiratory syndrome.

Exclusion criteria

Exclusion criteria adopted by this study were individuals with inconclusive tests for COVID-19, pregnant women, transplanted patients, individuals using immunosuppressive drugs and/or patients undergoing chemotherapy treatment.

Sample size

Serum samples were collected on the first day of admission from 78 individuals admitted to the ICU with a confirmed diagnosis of SARS-COV-2 infection. In the first study interval (June–August 2020), 65 patients were randomly selected. From the second study interval (January–February 2021), 15 patients were randomly selected. However, two samples had to be excluded from the analysis because they did not meet the inclusion criteria. After selection, the patients chosen were divided according to the clinical outcome of discharge and death. Thus, the total number of participants in this study comprised 40 fatal cases and 38 recovered cases.

Data collection

Sociodemographic and laboratory data were collected from electronic medical records available in the Ars Vitae system of the IJF. Only the laboratory results from the day of admission were included in the study.

Study objective

The study aimed to evaluate serum biomarkers of patients with SARS-CoV-2 admitted to the ICU relating to clinical outcomes of recovered or fatal.

Statistical measure

GraphPad Prism software version 8.0.1 was used for statistical analysis and data presentation. The Shapiro–Wilk test was applied to evaluate the normal or nonnormal distribution. Nonparametric categorical variables were expressed as absolute and relative frequency and tested for statistically significant differences using the Pearson chi-square test and Fisher test. Nonparametric continuous variables were presented as the median and interquartile range (IQR); data were analyzed by the Mann–Whitney *U* test. To explore the correlations between IL-18 and GM-CSF,

Table 1. Sociodemographic, clinical and laboratory characteristics of patients with severe COVID-19 in the intensive care unit of a tertiary hospital in the state of Ceara, northeastern Brazil.

Characteristics	Total (n = 78)	Fatal cases (n = 40)	Recovered (n = 38)	p-value
Men [†]	50 (64.1%)	28 (70%)	22 (57.9%)	0.3961
Women [†]	28 (35.9%)	12 (30%)	16 (42.1%)	0.4497
Age (years) [‡]	59 (22–97)	69.50 (22–97)	41 (22–82)	0.0001
Comorbidities [‡]				
Systemic arterial hypertension	24 (30.7%)	14 (35%)	10 (26.3%)	0.4142
Obesity/overweight	12 (15.4%)	5 (12.5%)	7 (18.4%)	0.5637
Diabetes mellitus 1 and 2	15 (19.2%)	11 (27.5%)	4 (10.5%)	0.0707
Heart diseases	13 (16.7%)	7 (17.5%)	6 (15.8%)	0.7815
Lung diseases	9 (11.5%)	4 (10%)	5 (13.2%)	0.7389
Cerebrovascular accident	6 (7.7%)	6 (15%)	0	0.0143
Former smokers	4 (5.1%)	3 (7.5%)	1 (2.6%)	0.3173
Former alcoholics	3 (3.8%)	3 (7.5%)	0	0.0833
Other	9 (11.5%)	5 (12.5%)	4 (10.5%)	0.7389
No comorbid adherence	32 (41%)	13 (32.5%)	19 (50%)	0.2888
Days of hospitalization (n) [‡]	12 (1–83)	10 (1–67)	14.50 (3–83)	0.2422
C-reactive protein [‡]	133.1 (0.7–515)	142.3 (0.7–488.8)	109.7 (2.1–515)	0.3716
D-dimer [‡]	2.420 (0.23–33.01)	2.440 (0.56–25.02)	2.370 (0.23–33.01)	0.3257
Leukocytes [‡]	13,615 (3730–35,660)	14,140 (3,820–29,560)	13,050 (3730–35,660)	0.5277
Neutrophils [‡]	12,235 (3148–31,808)	12,551 (3202–27,490)	10,718 (3148–31,808)	0.3267
Lymphocytes [‡]	998 (231–4478)	805 (306–2,874)	1,079 (231–4478)	0.0714
Neutrophil-lymphocyte ratio	11.79 (11.65–48)	12.79 (14.44–48)	10.33 (11.65–40.17)	0.0230
Monocytes [‡]	533 (0–2,088)	452.5 (76–2,088)	554.5 (0–1,676)	0.1694
Platelets [‡]	235,500 (48,000–564,000)	193,500 (48,000–511,000)	274,500 (68,000–564,000)	0.0063

[†]Absolute frequency (relative).

[‡]Median (interquartile range).

[§]Fatal cases, n = 32; recovered cases, n = 33. p 0.05.

IL-22, IL-23, age, platelets and lymphocytes, Spearman correlation analysis was performed due to the non-normal distributions of these variables. The results were considered statistically significant whenever the p-value was lower than 0.05 ($p < 0.05$).

Ethical approval

Informed consent was obtained from each involved participant. This study was approved by the National Research Ethics Commission (CONEP, protocol no. 4.026.888) and by the Research Ethics Committee of the Federal University of Ceara (PROPESQ /UFC, protocol no. 4.346.280).

3 Results

Among the 78 patients in the study, 40 (51.2%) died and 38 (48.8%) recovered. Most individuals were men (64.1%), with a median age of 59 (range: 22–97) years. Systemic arterial hypertension was the most frequent comorbidity (30.7%). Patients with a history of the cerebrovascular accident showed statistical significance compared with patients without comorbidity. Sociodemographic and clinical details are shown in Table 1.

When associating the categorical variables of comorbidities, the Pearson and Fisher chi-square tests showed a statistically significant association only between the groups with the cerebrovascular accident (CVA) and without comorbidities ($p = 0.0076$) for both recovered and fatal cases.

Fatal cases were older (median: 69.50; IQR: 22–97), had lower platelet concentration (median: 193.500; IQR: 167.000–256.000), higher neutrophil–lymphocyte ratio (NLR; median: 12.79; IQR: 14.44–48) and higher concentration of IL-18 (median: 139.2; IQR: 36.64–3.361.0) compared with recovered cases. Spearman correlation analysis showed that age ($r = 0.003$, $p > 0.05$), gender ($r = -0.1300$, $p > 0.05$), platelet count ($r = 0.04$, $p > 0.05$) and lymphocyte count ($r = -0.22$, $p > 0.05$) had no statistical significance with IL-18 levels.

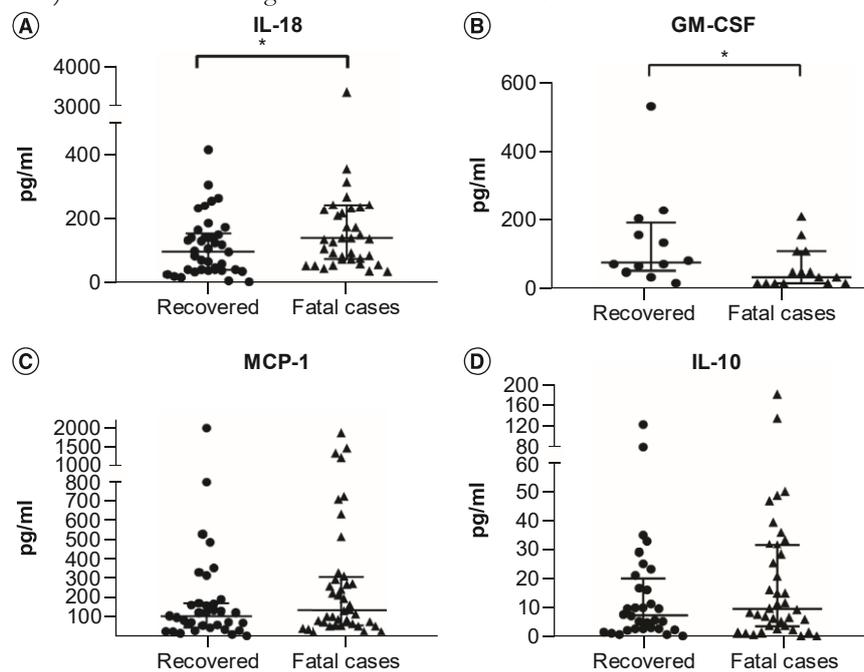


Figure 1. Comparison of IL-18, MCP-1, IL-10 and GM-CSF cytokine values between fatal and recovered cases, respectively. Mann–Whitney test (* $p < 0.05$). (A) IL-18 ($p = 0.009$; $n = 40, 38$). (B) GM-CSF ($p = 0.0187$; $n = 16, 12$). (C) MCP-1 ($p = 0.1863$; $n = 40, 35$). (D) IL-10 ($p = 0.3584$; $n = 38, 32$).

Some cytokines showed results below the lower limit of quantification. Therefore, only samples with detectable levels were used in the analyses. Despite the small sample size, GM-CSF ($n = 28$), IL-22 ($n = 19$) and IL-23 ($n = 8$) values were significantly lower in fatal cases ($p = 0.0187, 0.0473$ and 0.0313 , respectively). Increase in IL-18 was not correlated ($p > 0.05$) with changes in GM-CSF ($p = 0.2826$), IL-22 ($p = 0.3268$) or IL-23 ($p = 0.2417$). Despite nonsignificant results, IL-10 and MCP-1 are graphically presented as they were detected in most samples. Supplementary Table 1 demonstrates the medians and amounts of samples with detected levels for each cytokine. Figure 1 shows the comparisons of the cytokines IL-18, IL-10, MCP-1 and GM-CSF levels from fatal cases and recovered groups.

4 Discussion

IL-18 is elevated in fatal cases of COVID-19

In the present study, IL-18 levels were higher in patients who died compared with discharged patients with severe COVID-19. Recent studies show that the proportion of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines can be used for risk stratification in hospitalized patients with COVID-19. IL-18 has been reported as a predictor of infection severity [1,7-9]. Considering IL-18 biological functions, it was first reported to induce interferon- γ activity [10]. IL-18 regulates the Th1 and Th2 responses, and its increased production can lead to an exacerbated inflammatory state [3]. In COVID-19 patients, IL-18 has been studied for its role as a component of inflammasomes [11]. Inflammasomes are cytosolic protein complexes important in the innate immune response against pathogen-associated molecular patterns. From the activation of inflammasomes, proinflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-18 are activated and released into the extracellular environment, leading to pyroptosis (cell death by lysis) and inflammation. When this process is overactivated, exacerbated inflammation triggers the disease aggravation. Studies show that NLRP3 (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3) inflammasome is highly expressed in patients with COVID-19, being a potential marker of disease severity [11,12].

Furthermore, IL-18 is also associated with worsening and mortality in other viral diseases such as influenza and dengue [7]. Together with other cytokines, increased expression of IL-18 contributes to macrophage activation syndrome, a condition seen in autoimmune diseases and influenza. Previous studies revealed similarities in the pathogenesis of COVID-19 and macrophage activation syndrome [3,12].

Other relevant cytokines: GM-CSF, IL-10 & MCP-1

GM-CSF is a proinflammatory cytokine produced by macrophages, T cells, fibroblasts, endothelial cells and epithelial and tumor cells, with most of the production occurring in inflammatory sites. GM-CSF levels are low or undetectable under normal conditions. However, any immune trigger can rapidly increase its concentration [13]. Elevated levels of GM-CSF were found in the bronchoalveolar fluid of patients with SARS compared with healthy controls [14]. In addition, the use of GM-CSF and this cytokine inhibitor (anti-GM-CSF monoclonal antibodies) as a therapeutic strategy in COVID-19 has been reported. However, a dual role is related to GM-CSF, depending on the stage of the disease and the amount of this molecule [15].

In this study, the concentration of GM-CSF was lower in fatal cases compared with recovered patients, suggesting a positive role of a nondelayed or exacerbated response of this cytokine in the recovery of patients, associated, for example, with differentiation and activation of alveolar macrophages that contribute to viral clearance [16].

IL-10 is an anti-inflammatory cytokine described to be elevated in patients with severe COVID-19 [1,9]. Because of the inflammatory context of these individuals, it is believed that the increase in IL-10 would be a compensatory response of the body in an attempt to quell the inflammatory process. Elevated IL-10 was related to the T-cell exhaustion from the overactivation and proliferation of these cells [16]. MCP-1 is responsible for the recruitment of monocytes and macrophages, contributing to exacerbated inflammation and thromboembolic disorders when occurring in high amounts in the body. In COVID-19, its increase in critically ill patients has also been reported [1,17].

Comorbidities, age, platelets & NLR: significant in fatal cases

Several infectious agents are considered to be risk factors for CVA development. A systematic review by Kazemi *et al.* [18] showed that SARS-CoV-2 infection could be correlated with CVA. The putative mechanisms that may explain this relationship between stroke and COVID-19 include coagulopathies (especially thrombophilia), the expression of angiotensin-converting enzyme in CNS cells and interaction with SARS-CoV-2, endothelial dysfunction, microthrombosis and activation of the proinflammatory cytokine cascade. Klok *et al.* [19] reported that thrombotic complications occurred in 31% of critically ill ICU patients with SARS-CoV-2. Our study corroborates these findings, as it shows that patients with severe COVID-19 and stroke had a higher risk of death ($p = 0.0143$) than those without comorbidities.

Another significant finding of our study, consistent with other studies, is that older patients showed higher death rates ($p = 0.001$). Tjan *et al.* [8] reported that asymptomatic or mildly symptomatic patients were significantly younger than those with severe disease. Age-associated severe infection seems to be due to immunosenescence, followed by comorbidities and age-related variation in the expression of angiotensin converting enzyme 2 [20].

Patients with COVID-19 pneumonia exhibit coagulation abnormalities, often with mild thrombocytopenia. On average, patients with severe diseases have a lower platelet count than those with nonsevere disease [21]. Thrombocytopenia on admission in patients with COVID-19 was associated with 4.24-fold increased mortality risk [1]. Similarly, our results showed lower platelet count in individuals who died than in the discharge group. In agreement with Liu *et al.* [22], which showed that NLR, an inflammatory marker, is an independent risk factor for the individuals with COVID-19 in hospital mortality, the NLR of patients in our study was significantly higher in fatal cases. Thus, inflammatory and regulatory responses play a significant role in controlling the infection caused by SARS-CoV-2 and can also predispose to severe pulmonary and systemic manifestations in certain individuals. Factors associated with age, comorbidities and alteration in blood components may contribute to the poor prognosis in critically ill COVID-19 patients.

5 Conclusion

This study evidenced the prediction of the outcomes of COVID-19 patients from ICU through pro-inflammatory cytokine evaluation. Our results demonstrate that the concentration of IL-18 was higher in individuals with the clinical outcome of death. In addition, sociodemographic and laboratory characteristics such as advanced age, history of CVA, low platelet count and high NLR were related to fatal cases. Among the limitations of our study are the small sample size, absence of a control group without COVID-19 and with COVID-19 but not admitted to the ICU, and nonanalysis of the follow-up of patients with a serial sample.

Recognizing differences between high- and low-risk individuals with poor prognosis through biomarkers can help determine the best preventive and treatment therapy, in addition to helping to understand the pathogenesis of the disease.

Summary points

- Immune characteristics of individuals infected with COVID-19 have been extensively investigated.
- Unregulated inflammatory response, whether insufficient or exacerbated, triggers a lower capacity to resolve the disease, leading to harmful effects on the body.
- It is essential to investigate biomarkers that guide the prognosis of the SARS-CoV-2 infection; such knowledge helps in early and aggressive intervention in patient therapy.
- This cross-sectional study aimed to evaluate serum markers as predictors of poor clinical outcomes in unvaccinated patients admitted to the intensive care unit at a reference hospital for COVID-19 in Fortaleza in northeastern Brazil. The secondary aims were to evaluate the sociodemographic, clinical and laboratory characteristics of these patients.
- Seventy-eight patients met the inclusion criteria and were divided into two groups: fatal cases (n = 40) and recovered (n = 38).
- Sex, age, comorbidities, hospitalization length, C-reactive protein values, D-dimer, leukocytes, neutrophils, lymphocytes, neutrophil-lymphocyte ratio, monocytes and platelets, and levels of 20 cytokines were compared between the groups.
- Fatal cases were older and had lower platelet concentration, higher neutrophil-lymphocyte ratio and higher IL-18 concentration than recovered patients. Correlation analysis showed that age, sex, platelets, lymphocytes, GM-CSF, IL-22 and IL-23 had no statistical significance with IL-18.
- This study shows that elevated IL-18 predicts poor prognosis in critically ill COVID-19 patients. Combined with other studies, these findings can help determine the best preventive and treatment therapy.

Supplementary data

To view the supplementary data that accompany this paper please visit the journal website at: www.futuremedicine.com/doi/suppl/10.2217/fmb-2022-0057

Author contributions

LLC Coutinho and CN Oliveira contributed equally as combined first author. LLC Coutinho and CN Oliveira contributed in abstract and manuscript writing, data collection, data analysis and manuscript editing. PLMM Albuquerque contributed in conception of the work, data collection and writing of the manuscript. SMB Mota contributed in data collection and writing of the manuscript. GC Meneses contributed in design of the work, data collection and writing of the manuscript. AM Martins contributed in design of the work and writing and editing of the manuscript. GB Da Silva Junior contributed in writing and revising the manuscript. MA Clementino contributed in data acquisition and writing and editing of the manuscript. RNDG Gondim contributed in data acquisition and writing and editing of the manuscript. A Havt contributed to writing and editing of the manuscript and data analysis. LPG Cavalcanti contributed in the conception of the work and writing, editing and proofreading of the manuscript. JNU Yaochite contributed in the conception of the work and writing, editing and proofreading of the manuscript.

Acknowledgments

The authors thank Raphael de Oliveira Rodrigues for the assistance during experimental protocols.

Financial & competing interests disclosure

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq); Fundaco Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Cientifico e Tecnolgico (FUNCAP) and the Network of Clinical and Applied Research into COVID-19 (REBRACOVID) through funds from the Department of Science and Technology (DECIT), Brazilian Ministry of Health. The study was also financed by JBS S.A ('Fazer o bem faz bem' Program) and CAPES-EPIDEMIAS 09/2020 Program (no. 88881.505364/2020-01). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval. This study was approved by the National Research Ethics Commission (CONEP, protocol no. 4.026.888) and by the Research Ethics Committee of the Federal University of Ceara (PROPESQ /UFC, protocol no. 4.346.280). In addition, informed consent was obtained from the participants involved.

6 References

Papers of special note have been highlighted as: • of interest; •• of considerable interest

- Chi Y, Ge Y, Wu B *et al.* Serum cytokine and chemokine profile in relation to the severity of coronavirus disease 2019 in China. *J. Infect. Dis.* 222(5), 746–754 (2020).
•• This study describes the profile of cytokines and chemokines in both symptomatic and asymptomatic patients with COVID-19 infection, relating it to a possible increased severity of the disease.
- Azkur AK, Akdis M, Azkur D *et al.* Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 75(7), 1564–1581 (2020).
• Describes the possible immunological and clinical conditions that cause disease severity in certain individuals.
- Vecchie A, Bonaventura A, Toldo S *et al.* IL-18 and infections: is there a role for targeted therapies? *J. Cell. Physiol.* 236(3), 1638–1657 (2021).
•• Reports the importance of IL-18 in the regulation of the immune response in infections, demonstrating that its blockade may be a possible therapeutic target for COVID-19.
- Yoo JK, Kwon H, Khil L-Y *et al.* IL-18 induces monocyte chemotactic protein-1 production in macrophages through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and MEK/ERK1/2 pathways. *J. Immunol.* 175(12), 8280–8286 (2005).
- Tamayo-Velasco A, Pearrubia-Ponce MJ, Alvarez FJ *et al.* Evaluation of cytokines as robust diagnostic biomarkers for COVID-19 detection. *J. Pers. Med.* 11(681), 1–11 (2021).
- Lazaro APP, Albuquerque PLMM, Meneses GC *et al.* Critically ill COVID-19 patients in northeast Brazil: mortality predictors during the first and second waves including SAPS 3. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* doi: 10.1093/trstmh/trac046 (2022) (Epub ahead of print).
- Sati, s H, Selc, uk H, Aysert P *et al.* Prognostic value of interleukin-18 and its association with other inflammatory markers and disease severity in COVID-19. *Cytokine.* 137, 155302 ((2021).
•• Clarifies the role of IL-18 in the pathogenesis of COVID-19, correlating with other inflammatory markers and reflecting on the severity of COVID-19.
- Tjan LH, Furukawa K, Nagano T *et al.* Early differences in cytokine production by severity of coronavirus disease 2019. *J. Infect. Dis.* 223(7), 1145–1149 (2021).
- Lucas C, Wong P, Klein J *et al.* Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature* 584, 463–469 (2020).
- Okamura H, Hiroko T, Tshinori K *et al.* Cloning of a new cytokine that induces IFN-g production by T cells. *Nature* 378(7), 603–605 (1995).
- Rodrigues TS, de Sa KSG, Ishimoto AY *et al.* Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *J. Exp. Med.* 218(3), 1–11 (2020).
•• Shows the participation of inflammasome and IL-18 in the pathophysiology of COVID-19 and as a marker of disease severity.
- Cheon SY, Koo B-N. Inflammatory response in COVID-19 patients resulting from the interaction of the inflammasome and SARS-CoV-2. *Int. J. Mol. Sci.* 22(7914), 1–11 (2021).
- Aggarwal A, Baker CS, Evans TW, Haslam PL. G-CSF and IL-8 but not GM-CSF correlate with severity of pulmonary neutrophilia in acute respiratory distress syndrome. *Eur. Respir. J.* 15(5), 895–901 (2000).

14. Matute-Bello G, Liles WC, Radella F *et al.* Modulation of neutrophil apoptosis by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during the course of acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care Med.* 28(1), 1–7 (2000).
 15. Bonaventura A, Vecchie A, Wang TS *et al.* Targeting GM-CSF in COVID-19 pneumonia: rationale and strategies. *Front. Immunol.* 11(1625), 1–10 (2020).
 16. Lu L, Zhang H, Dauphars DJ, He Y-W. A potential role of interleukin 10 in COVID-19 pathogenesis. *Trends Immunol.* 42(1), 3–5 (2021).
 17. Chen Y, Wang J, Liu C *et al.* IP-10 and MCP-1 as biomarkers associated with disease severity of COVID-19. *Mol. Med.* 26(97), 1–12 (2020).
 18. Kazemi S, Pourgholaminejad A, Saberi A. Stroke associated with SARS-CoV-2 infection and its pathogenesis: a systematic review. *Basic Clin. Neurosci.* 12(5), 569–586 (2021).
 19. Klok FA, Kruip MJHA, Meer NJM van der *et al.* Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb. Res.* 191, 145–147 (2020).
- **Investigates the incidence of thrombotic complications in intensive care unit patients with COVID-19, which are found to be high. We found a difference in platelet concentration between fatal and recovered ICU cases.**
20. Costagliola G, Spada E, Consolini R. Age-related differences in the immune response could contribute to determine the spectrum of severity of COVID-19. *Immunity Inflamm. Dis.* 9(2), 331–339 (2021).
- **Addresses the contribution of age to the severity of COVID-19; our study found a significant age difference between the two groups.**
21. Wool GD, Miller JL. The impact of COVID-19 disease on platelets and coagulation. *Pathobiology* 88(1), 15–27 (2021).
 22. Liu Y, Du X, Chen J *et al.* Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19. *J. Infect.* 81(1), e6–e12 (2020).
- **Demonstrates results consistent with our findings regarding neutrophil-to-lymphocyte ratio as a risk factor for mortality in hospitalized COVID-19 patients.**