



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

SHARLA PAES GOMES

**ESTRATIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE
INTERLEUCINA 6 COM POTENCIAL PARA IDENTIFICAÇÃO
DE NOVOS BIOMARCADORES DE PROGNÓSTICO NA
COVID-19**

Recife
2023

SHARLA PAES GOMES

**ESTRATIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE
INTERLEUCINA 6 COM POTENCIAL PARA IDENTIFICAÇÃO
DE NOVOS BIOMARCADORES DE PROGNÓSTICO NA
COVID-19**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Biomedicina da
Universidade Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de Bacharel
em Biomedicina.

Orientadora: Dra. Angela Castoldi de
Albuquerque

Coorientadora: Dra. Patrícia d'Emery Alves
Santos

Recife
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Gomes, Sharla Paes.

Estratificação das concentrações de interleucina 6 com potencial para
identificação de novos biomarcadores de prognóstico na COVID-19 / Sharla Paes
Gomes. - Recife, 2023.

48 : il., tab.

Orientador(a): Angela Castoldi de Albuquerque

Cooorientador(a): Patrícia d'Emery Alves Santos

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

Inclui referências, anexos.

1. Citocinas. 2. Quimiocinas. 3. SARS-CoV-2. 4. IL-6. 5. Imunidade. I.
Albuquerque, Angela Castoldi de . (Orientação). II. Alves Santos, Patrícia
d'Emery . (Coorientação). III. Título.

610 CDD (22.ed.)

SHARLA PAES GOMES

ESTRATIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE INTERLEUCINA 6 COM POTENCIAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES DE PROGNÓSTICO NA COVID-19

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 25/04/2023

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 ANGELA CASTOLDI DE ALBUQUERQUE
Data: 02/05/2023 20:38:05-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Orientador: Prof. Dra. Angela Castoldi de Albuquerque
Universidade Federal de Pernambuco - Instituto Keizo Asami (iLIKA).

Documento assinado digitalmente
 VIRGINIA MARIA BARROS DE LORENA
Data: 02/05/2023 18:58:02-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dra. Virginia Maria Barros de Lorena
Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ - PE

Documento assinado digitalmente
 CASSIA GISELLE DE OLIVEIRA NOBREGA
Data: 03/05/2023 10:59:41-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dra. Cassia Giselle de Oliveira Nóbrega
Universidade Federal de Pernambuco - Instituto Keizo Asami (iLIKA).

Dedico esta monografia à minha mãe,
Jaciara, e ao meu avô, José Ribeiro (*in
memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Dra. Angela Castoldi, pela oportunidade e o privilégio de fazer parte do seu grupo de pesquisa, assim como pela confiança na minha capacidade intelectual enquanto aluna e por todo conhecimento passado durante o último ano. À minha coorientadora Dra. Patrícia d'Emery, por toda paciência e disponibilidade em ajudar e ensinar. Gostaria de agradecer ao Prof. Fabricio Souto por disponibilizar as amostras necessárias para o desenvolvimento deste trabalho. Ao departamento de imunologia do ILIKA, por disponibilizar as instalações para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos que surgiram durante a vida acadêmica, Bárbara Lacerda, Gabriely, Stephany, Eduarda, Barbara, Agenor, Mirella, Milena, Juliana, V. Milena, Taynara. Aos que permanecem aqui há tantos anos Sandy, Cleycianne, Karla, Barbara Moura, Eduarda Gouveia, Zaqueu, Tailson, Edinaldo, Bárbara Amorim, e Rafaela. Obrigada, por terem tornado, de forma direta ou indireta, o ambiente acadêmico mais leve e suportável e por todo o incentivo demonstrado.

Gostaria de agradecer a minha família por todo apoio nos últimos anos. Em especial a minha Vó Creuza, por todo o incentivo emocional e financeiro em toda a minha vida. Ao meu pai, Edivaldo. Ao meu irmão, Carlos Eduardo. A minha tia Eliane, por não medir esforços em me auxiliar.

Por último, mas não menos importante, agradeço a minha mãe, Jaciara, por todo o apoio emocional e financeiro desde o início da minha existência. Obrigada por ser minha companheira número 1 em todos os caminhos que escolhi. Ao Constantino e ao Summer, por serem uma fonte inesgotável de amor.

“E, no entanto, ela se move”

Galileu Galilei

GOMES, Sharla Paes. Estratificação das concentrações de Interleucina 6 com potencial para identificação de novos biomarcadores de prognóstico na COVID-19. 2023. 48 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

A clínica frente a infecção por SARS-CoV-2 é diversificada, podendo variar de leve, moderada, a grave, contudo, o agravamento ou desfecho fatídico não pode ser explicado por um único fator. No entanto, a exacerbação da resposta imune com a secreção de diversas citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 β , IL-2, IL-8, TNF- α parece ser decisiva para a progressão da doença gerando um quadro de hiperinflação. A IL-6, uma importante citocina pró-inflamatória, com diversas funções, incluindo, atividade sobre a resposta imune frente às infecções virais, vem sendo associada como fator de importância para o agravamento dos casos de COVID-19. Foi observado que pacientes COVID-19 com níveis de IL-6 aumentados apresentaram maior extensão de dano pulmonar, além disso, as células imunes como os monócitos, macrófagos passaram a secretar IL-6 em decorrência da infecção. No presente estudo analisamos, a partir da quantificação de citocinas, quimiocinas, por citometria de fluxo, e de marcadores de severidade ambulatoriais (PCR (proteína C reativa), LDH, ferritina), obtidos a partir de prontuário, o potencial de IL-6 como um marcador de severidade da COVID-19, assim como, a possibilidade de outros biomarcadores. Amostras de 36 pacientes COVID-19 grave, foram estratificadas em IL-6 Baixo: 0 a 30 pg/ml; Médio 31 a 200 pg/ml; Intermediário: 201 a 999 pg/ml; e Alto: >1000 pg/ml. Desta forma, foi possível observar uma correlação entre os níveis de IL-6 e IL-8, sugerindo uma associação entre o aumento de IL-6 e IL-8. IL-6, CXCL9 e CCL5 apresentaram associação com pior desfecho clínico.

Palavras-chave: Citocinas. Quimiocinas. SARS-CoV-2. IL-6. Imunidade.

GOMES, Sharla Paes. Stratification of Interleukin 6 concentrations with potential for identification of novel prognostic biomarkers in COVID-19. 2023. 48 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

The clinical picture of SARS-CoV-2 infection is diverse, ranging from mild, moderate, to severe; however, the worsening or fatal outcome cannot be explained by a single factor. However, the exacerbation of the immune response with the secretion of several pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-1 β , IL-2, IL-8, TNF- α seems to be decisive for the progression of the disease generating a picture of hyperinflation. IL-6, an important pro-inflammatory cytokine with several functions, including activity on the immune response to viral infections, has been associated as an important factor for the worsening of COVID-19 cases. It has been observed that COVID-19 patients with increased levels of IL-6 had a greater extent of lung damage; moreover, immune cells such as monocytes and macrophages started secreting IL-6 as a result of the infection. In the present study we analyzed from quantification of cytokines, chemokines, by flow cytometry, and outpatient severity markers (CRP (C-reactive protein), LDH, ferritin), obtained from medical records the potential of IL-6 as a marker of severity of COVID-19, as well as, the possibility of other biomarkers. Samples from 36 severe COVID-19 patients, were stratified into Low IL-6: 0 to 30 pg/ml; Medium 31 to 200 pg/ml; Intermediate: 201 to 999 pg/ml; and High: >1000 pg/ml. Thus, a correlation between IL-6 and IL-8 levels could be observed, suggesting an association between increased IL-6 and IL-8. IL-6, CXCL9 and CCL5 were associated with worse clinical outcome with worse clinical outcome.

Key words: Cytokines. Chemokines. SARS-CoV-2. IL-6. Immunity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática do SARS-CoV-2.	14
Figura 2 – Distribuição mundial de casos confirmados de COVID-19	15
Figura 3 – Média de Idade dos pacientes estratificados pelas concentrações de IL-6	26
Figura 4 – Concentração de IL-8 em pacientes COVID-19 grave.	27
Figura 5 – Concentração de IL-10 em pacientes COVID-19 grave.	28
Figura 6 – Concentração sérica das quimiocinas CXCL9 e CCL2	29
Figura 7 – Concentrações séricas de CXCL10	31
Figura 8 – Concentrações de IL-6 vs. dano pulmonar (% de acometimento)	32
Figura 9 – Mediadores inflamatórios em pacientes COVID-19 grave	32
Figura 10 – Gráfico de correlação entre IL-6 e óbito	34
Figura 11 – CCL5 em pacientes COVID-19 grave	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 SARS-CoV-2	12
2.1.1 Aspectos Gerais	12
2.1.2 Cenário Epidemiológico	14
2.2 Aspectos imunológicos	16
2.2.1 Citocinas	18
3 OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo Geral	22
3.2 Objetivos Específicos	22
4 JUSTIFICATIVA	23
5 METODOLOGIA	23
5.1 Desenho do Estudo	23
5.2 Coleta de dados	24
5.3 Dosagem das Citocinas por CBA	24
5.4 Análise estatística	25
5.5 Aspectos éticos	25
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
7 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	37
ANEXO	46
Parecer comitê de ética	46

1 INTRODUÇÃO

O SARS-CoV-2 é o agente etiológico da COVID-19, que foi declarada como pandemia em março de 2020, pela Organização Mundial da Saúde (OMS). As manifestações clínicas da COVID-19 variam de leves a graves podendo culminar em síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e na falência de múltiplos órgãos (SANTA CRUZ et al., 2021). O vírus infecta as células hospedeiras incluindo macrófagos CD169+ por meio da ligação da proteína Spike a enzima conversora de angiotensina (ACE2), proteína de superfície expressa em diferentes órgãos, incluindo coração, rins e pulmões, e ainda, células endoteliais (LIU et al., 2020; GUBERNATOROVA et al., 2020).

A relação entre sistema imune e os mecanismos de evasão utilizados pelos vírus desempenham um papel na gravidade da doença (CHANNAPPANAVAR; PERLMAN, 2017). Os monócitos, células envolvidas na resposta imune a patógenos quando infectados por SARS-CoV-2, expressaram níveis de interferon (IFN) α , β e λ mais altos, assim como, de citocinas pró-inflamatórias incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6 (CODO et al., 2020). Para mais, macrófagos e células dendríticas também passam a secretar IL-6 e outras citocinas inflamatórias diante da infecção por Betacoronavírus (MOORE; JUNE, 2020).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que exerce papel na maturação de células plasmáticas, na produção de mediadores inflamatórios agudos e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (KANG; KISHIMOTO, 2021). No mais, IL-6 pode sinalizar por duas vias: via clássica e através de trans sinalização. Na via clássica o receptor de IL-6 (IL-6R) é expresso na membrana de algumas células, entre elas: neutrófilos, monócitos, células B e T CD4 (NARAZAKI; KISHIMOTO, 2018). Entretanto, na trans sinalização IL-6 forma um complexo com sIL-6R (receptor solúvel de IL-6) e a gp130, IL-6/sIL-6R/gp130, dessa forma, células que não expressam IL-6R de membrana podem ser estimuladas, subsequente a essa sinalização há o estímulo para células endoteliais secretarem a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (KANG; KISHIMOTO, 2021; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2018). Vale mencionar que a trans sinalização da IL-6 é provavelmente patogênica na COVID-19 progressivo grave: por meio dela, a IL-6 pode regular positivamente quimiocinas (exemplo; CCL2, IL-8), além de, moléculas de adesão, fatores

pró-coagulantes, podendo contribuir para inflamação difusa em vários níveis, incluindo inflamação pulmonar (ZIZZO et al., 2022).

Dessa forma, a extensão das atividades de IL-6, pode ser decisiva para a progressão da doença. Foi visto, que nos pulmões de pacientes COVID-19, as células epiteliais respiratórias podiam liberar IL-6 quando infectadas por SARS-CoV-2, bem como em casos de infiltração por monócitos e macrófagos (ZIZZO et al., 2022). Adicionalmente, há pacientes que expressaram IL-6 baixa mesmo com COVID-19 grave e que foram tratados com tocilizumab (anticorpo monoclonal que bloqueia os receptores de IL-6) e não apresentaram melhora. Possivelmente, outras citocinas estão causando a resposta imune exacerbada nesses pacientes (GALVÁN-ROMÁN et al., 2021).

Citocinas como IL-1 β , TNF, IFN- β , IFN- γ , auxiliam na eliminação do vírus, assim como, na homeostase celular (DIAMOND; KANNEGANTI, 2022). Na COVID-19 foi observado que pacientes graves apresentavam assinatura de IFN I notavelmente prejudicada quando comparados a casos leves/moderados. Os IFNs tipo I (IFN- α/β) a partir da fosforilação e dimerização de STAT1 e STAT2 levam formação de um complexo (STAT-IRF-9) que irá induzir os genes estimulados por interferon que estão envolvidos na ativação de células T e B, afetando assim a magnitude e a resolução da resposta imune adaptativa para eliminação do vírus (ISLAMUDDIN et al., 2022).

Baseado nas diferenças da resposta imune em pacientes COVID-19 graves, no presente estudo estratificamos os pacientes em IL-6 baixa, média, intermediária e alta. A partir da quantificação por citometria de fluxo, para análise de IL-6 como potencial biomarcador, assim como, outras citocinas inflamatórias (IL-8, IL-10, INF γ , e TNF).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SARS-CoV-2

2.1.1 Aspectos Gerais

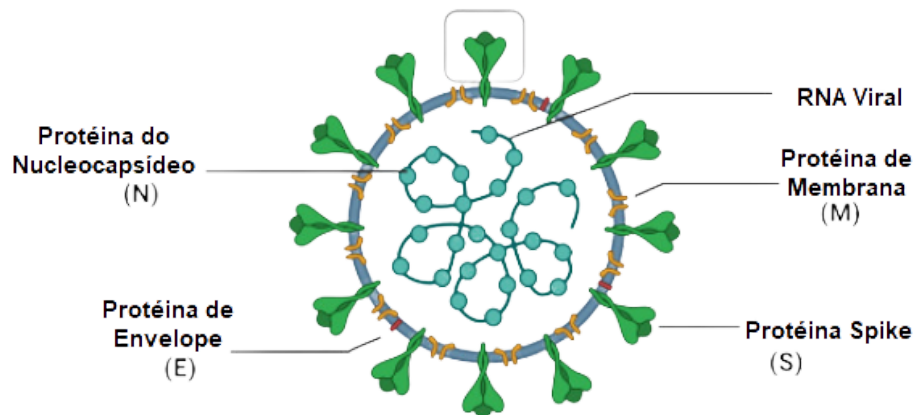
Em dezembro de 2019, foi observado um surto de pneumonia atípica na

cidade de Wuhan, China. Posteriormente, por meio de técnicas de sequenciamento e isolamento viral, a partir do lavado broncoalveolar, foi relatado que se tratava de um novo coronavírus (nCoV), SARS-CoV-2, até então não identificado em humanos. Nas semanas seguintes, a alta eficiência de transmissão apresentada pelo nCoV e a abundância de viagens internacionais permitiram a sua rápida disseminação mundial levando a Organização Mundial da Saúde (OMS) a declarar, em março de 2020, a pandemia do COVID-19, doença decorrente da infecção por SARS-CoV-2, um Betacoronavirus pertencente à família *coronaviridae*, com capacidade para infectar pulmões e trato respiratório humano (LIU et al., 2020; MOORE; JUNE, 2020; HU et al., 2021; VALDÉS et al., 2022).

Os coronavírus são uma família de vírus extensa que infectam múltiplos vertebrados, incluindo, humanos e podem causar doenças respiratórias que variam de resfriados comuns a quadros graves como o da SDRA (síndrome do desconforto respiratório agudo). Os primeiros casos de infecção respiratória em humanos por CoVs são da década de 60 e apresentavam manifestações leves. No entanto, nas duas últimas décadas surgiram três surtos de proporções significativas em consequência dos coronavírus. São elas: a epidemia da SARS-CoV (Síndrome Respiratória Aguda Grave) que ocorreu entre os anos de 2002 e 2003. A epidemia de MERS-CoV (Síndrome Respiratória do Oriente Médio), em 2012. Sendo o terceiro grande surto, a pandemia da SARS-CoV-2, com início em 2020 (KIRTIPAL; BHARADWAJ; KANG, 2020; HU et al., 2021).

O SARS-CoV-2, tal como os outros membros do seu gênero, apresenta um RNA de fita simples de sentido positivo, envelopado (MISTRY et al. 2022). Assim como, uma estrutura cap 5' e cauda poli-A 3', permitindo atuar como RNAm para a tradução de replicases. Além disso, há quatro proteínas estruturais principais, são elas: a Spike (S), Envelope (E), Membrana (M) e Nucleocapsídeo (N), importantes para ligação aos receptores celulares, patogenicidade e replicação (KAPTEN; ORCZYK; SMOLEWSKA, 2023; RAHIMI; MIRZAZADEH; TAVAKOLPOUR, 2021). Na extremidade 5' do seu genoma também pode ser encontrada a poliproteína OF1a/b, que codifica duas poliproteínas PP1ab e PP1a que serão processadas por duas proteases virais. A Mpro e PLpro, para a produção de dezesseis proteínas não estruturais (NSPs) que desempenham funções que vão desde da síntese, revisão e modificação do RNA, a modulação da imunidade do hospedeiro (KIRTIPAL; BHARADWAJ; KANG, 2020; KADAM et al., 2021).

Figura 1: Representação esquemática do SARS-CoV-2.



Fonte: Adaptado de MISTRY et al., 2022

A entrada do vírus na célula hospedeira pode ser mediada pela ligação da proteína S viral à enzima conversora de angiotensina (ACE2). A proteína S é dividida em duas subunidades: S1 domínio de ligação e S2 domínio de fusão. A subunidade S1 liga-se a ACE2 por meio do RBD (domínio de ligação ao receptor) (TAO et al., 2021), enquanto S2 é responsável pela fusão do genoma e das partículas virais as células hospedeiras. Para que esse processo ocorra a proteína S é clivada pela protease hospedeira furina e pela serino protease transmembranar 2 (TMPRSS2) nos sítios S1/S2, respectivamente. Entretanto, outras vias podem ser usadas para infectar as células, por meio da utilização de receptores como o neuropolina-1 e CD147 (KAPTEN; ORCZYK; SMOLEWSKA, 2023; ROMANO et al., 2020) Com a entrada do RNA viral nas células, a ORF1a/b vai ser traduzida pelos ribossomos. Dessa forma, a NSPs se agrupam em compartimentos de replicação e transcrição. No mais, após a produção das proteínas virais irá ocorrer a formação dos vírions no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi (YANG; RAO, 2021).

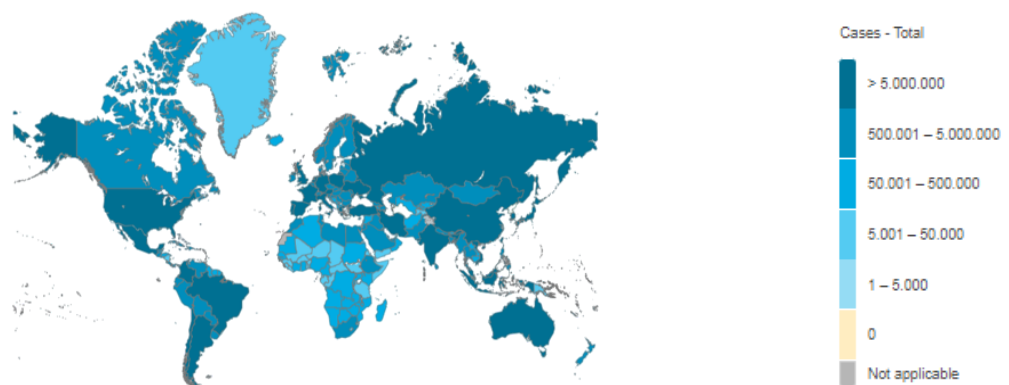
2.1.2 Cenário Epidemiológico

Hu et al. (2021) relataram que os primeiros vinte sete pacientes hospitalizados tinham relação com um mercado úmido localizado na cidade de Wuhan. Nesse mercado eram comercializados frutos do mar e animais vivos. No final de dezembro de 2019, autoridades sanitárias chinesas notificaram à OMS a respeito de um surto de pneumonia de causa desconhecida que posteriormente

seria indenticado como consequência do SARS-CoV-2. Estima-se que o SARS-CoV-2 tenha origem zoonótica, assim como, o SARS-CoV e o MERS (WU et al., 2020; MALLAPATY, 2023). Do início da pandemia até março de 2023, já foram registrados 761.402.282 milhões de casos confirmados em todo o mundo, incluindo 6.887.000 de mortes por COVID-19 (OMS,2023).

No Brasil, o primeiro caso de COVID-19 foi confirmado pelo Ministério da Saúde em 26 de fevereiro de 2020, na cidade de São Paulo. Menos de dois meses após o primeiro registro, os números saltaram para 20.727 casos confirmados em todas as regiões do país (BRASIL,2020). Desde então, 37.258.663 de casos foram confirmados, entre eles 700.239 mortes, atualizado em 31 de março de 2023 (BRASIL,2023). A disseminação do COVID-19 no território brasileiro ocorreu de forma diversificada, sendo possível observar uma taxa de letalidade diferente nas suas regiões, possivelmente em consequência da diversidade demográfica, aplicação de medidas de controle e a ocorrência de diferentes variantes (WOLF et al., 2022).

Figura 2: Distribuição mundial de casos confirmados de COVID-19



Fonte: WHO Coronavírus (COVID-19) Dashboard.

Diante da necessidade de monitoramento do SARS-CoV-2 a OMS formou um grupo de monitoramento, Grupo Consultivo Técnico sobre a Evolução do Vírus SARS-CoV-2, que classifica as variantes em: variantes de interesse (VOIs), variantes preocupantes (VOCs) e variantes sob monitoramento (VUMs) (OMS,2023). A ocorrência de mutações é um processo natural e esperado durante a evolução viral. As alterações encontradas podem transcorrer na substituição de nucleotídeos,

inserção ou deleção de componentes do genoma viral durante a replicação. O SARS-CoV-2 apresenta taxa de mutação elevada e consequentemente diversas variantes foram relatadas (YANG; RAO, 2021; OPAS,2021). As taxas de transmissão alta podem ter fomentado o surgimento de diversas variantes. Tendo em vista, que quanto maior for o número de infectados maior será a probabilidade de mutações (SCOVINO et al., 2022).

Até o momento são classificadas como VOCs a variante Alpha (B.1.1.7), identificada no Reino Unido em setembro de 2020, Beta (B.1.351), reportada na África do Sul em outubro de 2020, Gamma (P.1), identificada no Brasil em janeiro de 2021, Delta (B.1.617.2), detectada na Índia no final de 2020 e Ômicron (B.1.1.529), relatada na África do Sul em novembro de 2021, sendo atualmente, a cepa com maior disseminação representando 98% dos sequenciamentos genéticos disponíveis. A Ômicron representa a maior probabilidade de novas variantes do SARS-CoV-2. No mais, as mutações podem culminar em alterações nas propriedades virais, como o modo de transmissão, a gravidade da doença associada, a detecção por ferramentas de diagnóstico, a resposta a agentes terapêuticos e a eficácia das vacinas, colocando em risco os programas de imunização (SCOVINO et al., 2022; TAO et al., 2021; BURIONI; TOPOL, 2021; OMS,2023)

2.2 Aspectos imunológicos

A interação entre o SARS-CoV-2 e o sistema imunológico culmina em um quadro sintomatológico. Que vai desde ausência de sintomas a febre, mialgia, fadiga, produção de escarro, dispneia, pneumonia a acometimento do sistema respiratório inferior em graus variados. Com a invasão do vírus às células do hospedeiro, são desencadeadas uma série de reações envolvendo a imunidade inata e adaptativa com o intuito de eliminar o agente invasor (WIERSINGA et al., 2020; MURALIDAR et al., 2020)

A imunidade inata é a primeira linha de defesa diante de agentes infecciosos. Quando uma resposta antiviral é desencadeada, a imunidade inata é responsável por detectar, defender e criar uma ponte para a resposta adaptativa. As respostas imunes inatas integram componentes do sistema complemento, humoral, cascatas de coagulação-fibrinólise, liberação de citocinas, assim como,

componentes celulares como células natural killer (NK) e outros leucócitos fagocíticos. Quando o SARS-CoV-2 infecta as células hospedeiras, os PAMPs (padrões moleculares associados ao patógeno) vão ser reconhecidos por PRRs (receptores de reconhecimento de padrões), como TLR9 Toll-like (TLR2, TLR3 e TLR7) ou pelo sensor de RNA viral RIG-1 e MDA5 (gene 5 associado à diferenciação de melanoma). A partir do reconhecimento, vários fatores de transcrição são ativados, resultando na secreção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-1 e IL-6, entre outros, por monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas no local da infecção. No mais, o processo de sinalização da imunidade inata deve ser bem regulado, pois a ativação excessiva leva à inflamação sistêmica e danos aos tecidos (MISTRY et al., 2022; SILVA et al., 2022; MURALIDAR et al., 2020).

Por outro lado, as respostas imunes adaptativas também são desencadeadas pela infecção por SARS-CoV-2, em especial as células dendríticas apresentadoras de antígenos, que produzem citocinas, e migram para os linfonodos para apresentar o antígeno viral às células T virgens (naive), consequentemente, induzindo sua diferenciação e migração para o tecido afetado. Os linfócitos T são importantes componentes da imunidade adaptativa e vacinação, além de desempenhar um papel crítico na produção de anticorpos neutralizantes e eliminação direta do vírus (CHEN et al., 2021). No entanto, a hiperativação de células T citotóxicas foi descrita como um determinante da gravidade de COVID-19. Observou-se que a super ativação de células T CD8 poderia desencadear mecanismos potenciais para lesão cardíaca na COVID-19 grave. Além disso, as células B produtoras de anticorpos específicos para vírus também estão presentes (GUBERNATOROVA et al., 2020). O SARS-CoV-2 induz uma resposta de células B extrafoliculares seguida por uma resposta do centro germinativo. Durante a resposta extrafolicular, plasmócitos de vida curta e células B de memória atípica são gerados. Já durante a fase do centro germinativo, células B de memória clássicas e células plasmáticas de vida longa vão ser geradas. Nos casos de COVID-19 grave, o início da via do centro germinativo ocorre apenas com atraso ou não ocorre. Nesses casos, observou-se uma expansão de células B de memória atípicas, enquanto o número e a proporção de células B de memória clássicas diminuíram (VÁLYI-NAGY et al., 2022).

O sistema imunológico do hospedeiro atua em duas vertentes, podendo exercer um papel benéfico no controle da infecção ou um papel prejudicial que leva à imunopatogênese. Acontece que uma resposta imune coordenada entre a imunidade inata e adaptativa resulta na eliminação viral de forma eficiente (MURALIDAR et al., 2020). Por outro lado, após infecções virais acontece a liberação, por parte da imunidade inata, de INF I e III que atuam inibindo a replicação do vírus e sinalizando “emergência” às células vizinhas. Na COVID-19 grave, no entanto, devido a mecanismo de evasão viral - NSPs e proteínas estruturais M,N,S- houve prejuízo na produção de IFNs e na regulação de genes estimulados por IFNs. Ademais, se a resposta do IFN-I/III for inadequada ou atrasada, o sistema de defesa não consegue mais controlar a replicação inicial. Como a resposta adaptativa das células T e B também é atrasada, o sistema imune inato tenta compensar pela hiperatividade patológica, levando a uma resposta inata maciça que resulta em imunopatologia pulmonar excessiva. Tudo isso leva a tempestade de citocinas e danos subsequentes em vários órgãos (RAMASAMY; SUBBIAN, 2021; VÁLYI-NAGY et al., 2022; CHEN et al., 2021).

2.2.1 Citocinas

As citocinas são um grupo de proteínas com diversas funções, que regulam e coordenam muitas atividades das células da imunidade inata e adaptativa ((ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Após a síntese viral, as células infectadas podem sofrer apoptose ou necrose, desencadeando a resposta inflamatória com produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação de macrófagos (GUBERNATOROVA et al., 2020). Por sua vez, a infecção de células imunes por SARS-CoV-2 leva a expressão descontrolada de mediadores inflamatórios em casos graves, como as citocinas IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF- α , proteína quimioatraente de monocitos-1 (MCP-1); quimiocinas entre elas: CCL2, CCL3, CCL5, CCL8, CXCL8, CXCL9, CXCL10 (Tabela 1). Além das respostas de IFN tipo I e tipo III prejudicadas. Para mais, a superprodução de citocinas aumenta a permeabilidade da membrana da parede capilar ao redor dos alvéolos, causando edema pulmonar, dispnéia e hipoxemia. O vírus infecta principalmente células epiteliais alveolares tipo 2, ligando-se ao ACE2 presente na superfície celular. Com a perda da elasticidade

alveolar devido à menor produção de surfactante em consequência da infecção por SARS-CoV-2 contribuir para o desenvolvimento de SDRA em pacientes com COVID-19 (VÁLYI-NAGY et al., 2022; LIU et al., 2020; SILVA et al., 2022).

Tabela 1: Mediadores inflamatórios e suas respectivas funções

Mediador	função
Citocinas	
Interleucina-1	Pró-inflamatória; função pirogênica, ativação de macrófagos e células Th17
Interleucina-6	Pró-inflamatória; função pirogênica, aumento da produção de anticorpos, indução de reagentes de fase aguda
Interleucina-10	Antiinflamatória; inibição de células Th1 e liberação de citocinas
Interferon-γ	Pró-inflamatória; ativação de macrófagos
Fator de necrose tumoral	Aumento da permeabilidade vascular; função pirogênica
Quimiocinas	
Interleucina-8 (CXCL8)	Recrutamento de neutrófilos
CXCL9	Recrutamento de células Th1, células NK, células dendríticas plasmocitóides
CXCL10	Recrutamento de macrófagos, células Th1, células NK
CCL2	Recrutamento de células Th2, monócitos, células dendríticas, basófilos
CCL3	Recrutamento de macrófagos, células Th1, células NK, eosinófilos, células dendríticas; função pirogênica
CXCL13	Recrutamento de células B, células T CD4, células dendríticas

Fonte: FAJGENBAUM; JUNE, 2020

A tempestade de citocinas é uma rede complexa de interações entre moléculas imunologicamente importantes e eventos moleculares expressos nas inflamações sistêmicas que pode culminar em SDRA. A IL-6 parece ter um papel decisivo nesses quadros, sendo uma citocina com ação multidiversificada que age sobre mecanismos inatos e adquiridos. É produzida principalmente por macrófagos e linfócitos T em resposta a patógenos e é fundamental para o controle de várias infecções virais (SILVA et al., 2022; SANTA CRUZ et al., 2021). IL-6 é um mediador solúvel produzido em resposta a infecções e lesões teciduais, contribui para a defesa do hospedeiro por meio da estimulação de respostas de fase aguda, hematopoiese e reações imunes. Desempenha também um papel importante na resposta imune adquirida por estimular a produção de anticorpos e o desenvolvimento de células T efectoras. Além disso, a IL-6 pode viabilizar a diferenciação ou proliferação de várias células não imunes. Desempenhando assim uma importante função na ligação da resposta imune inata à adquirida (TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014; CHOY et al., 2020).

Na circulação de pacientes com COVID-19, a IL-6 atinge seu pico em estágios avançados, esse aumento é acompanhado por concentrações máximas de IL-10 e PCR. A produção de IL-6 é colocada em um loop autoinflamatório ligado à piroptose e à produção de IL-1 que é induzida por PAMPs associados a vírus via inflamassoma NLRP3 (ZIZZO et al., 2022). LIU et al.(2020) também relataram o aumento significativo de IL-6 nos casos graves, além disso, um outro estudo descreve que a elevação de IL-6 estava associada a maior necessidade de ventilação mecânica invasiva (GALVÁN-ROMÁN et al., 2021). Para tentar minimizar os efeitos de IL-6 sobre a tempestade de citocinas, foi usado um anticorpo monoclonal, o Tocilizumabe, que é um anti-receptor de IL-6. O Tocilizumabe é usado para o tratamento de outras doenças com perfil inflamatório como a doença de Castleman, artrite reumatóide e artrite idiopática juvenil. Nos casos de COVID-19, alguns grupos mostram relação positiva entre o tratamento com Tocilizumabe e melhora nos níveis de IL-6 (NARAZAKI; KISHIMOTO, 2018 ;GALVÁN-ROMÁN et al., 2021; CAPRA et al., 2020). No entanto, CANZIANI et al., (2020) relatou que o uso de Tocilizumabe não foi associado a uma mudança significativa no desfecho clínico dos pacientes com COVID-19 grave com SDRA. Sugerindo que outras proteínas também têm um papel importante na severidade desses pacientes.

2.3 Identificação de biomarcadores

No geral, um biomarcador é uma medida objetiva de uma característica biológica que pode ser utilizada para indicar um estado anormal ou normal de um organismo, ou seja, para discriminar infecção de condições não infecciosas, podendo adotar valor de prognóstico, atribuir perfis de risco e prever resultados (SANDQUIST; WONG, 2014). Ademais, a maior parte dos biomarcadores são variáveis contínuas no qual um valor de corte é atribuído para determinar a presença de uma condição ou não. Além disso, pode-se definir uma assinatura de biomarcadores multivariados, por exemplo, um biomarcador combinatório, relatando microambiente de tecido molecular. O processo para padronizar e definir os valores de corte para painéis de biomarcadores é um desafio, assim como a tradução do laboratório para a clínica (PITKÄNEN et al., 2019).

Razoavelmente, é possível que os níveis séricos de citocinas possam ser usados como biomarcadores para a síndrome da tempestade de citocinas (SRC) induzida pela infecção por SARS-CoV-2, devido às características naturais do quadro como inflamação sistêmica significativa com citocinas pró-inflamatórias elevadas (WANG; HAN, 2018; RAMASAMY; SUBBIAN, 2021; MOORE; JUNE, 2020; QUARTUCCIO et al., 2020). Entre elas, a IL-6 é um mediador importante da fisiopatologia da tempestade de citocinas e resposta inflamatória aguda, pode estar aumentada nos casos de COVID-19, em consequência da hiperativação de células T. Além disso, IL-6 pode alterar as atividades citotóxicas associadas a células Natural Killer (NK) causando diminuição na produção de granzima e perforina moléculas envolvidas com a eliminação de células infectadas (TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014; FAJGENBAUM; JUNE, 2020; BÖTTCHER et al., 2014).

Com isso a produção excessiva de IL-6 vem sendo relatada como um mediador inflamatório importante para a SRC e consequentemente associada aos casos de COVID-19 grave (KANG; KISHIMOTO, 2021; DEL VALLE et al., 2020). Anteriormente, citocinas pertencentes a família de IL-6 já foram relatadas como biomarcadores para câncer por um processo de triagem de mediadores inflamatórios. Neste mesmo estudo, IL-6 e osteopontina tiveram valores preditivos associados ao prognóstico de hepatocarcinoma, independentemente, de outras variáveis, como infecção pelos vírus da hepatite (UNVER; MCALLISTER, 2018) demonstrando o potencial de identificação da IL-6 em quadros inflamatórios, Para

mais, outros mediadores inflamatórios também foram associados ao agravamento da COVID-19 como CCL2 (LUCAS et al., 2020) , CXCL9 e CXCL10 (LIAO et al., 2020).

A sinalização de IL-6 pode acontecer de duas formas, via clássica e trans-sinalização, sendo mediado pela glicoproteína gp130, formando o complexo com o IL-6/IL-6R. Quando IL-6 liga-se ao receptor gera mudança conformacional na gp130, assim, é desencadeando uma cascata de sinalização a jusante, como Janus quinases/transdutores de sinal e ativadores de transcrição (Jak/STAT). A sinalização clássica da IL-6 induz a resposta de fase aguda sendo considerada como tendo efeitos homeostáticos e anti-inflamatórios. Enquanto a trans-sinalização da IL-6 regula principalmente as reações pró-inflamatórias (BARAN et al., 2018) Há um número considerável de estudos relatando um resultado favorável ao bloqueio da sinalização de IL-6 em pacientes com COVID-19 grave (KANG; KISHIMOTO, 2021; SOMERS et al., 2021; KAYE; SIEGEL, 2020). Também foi relatado por LAGUNA-GOYA et al. (2020) em seu estudo que IL-6 estava aumentada em não sobreviventes. Ademais, o nível sérico de IL-6 pode ser relevante não só para o prognóstico, mas também para uma melhor tomada de decisões terapêuticas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Compreender o papel da Interleucina 6 como um preditor de mau prognóstico frente a infecção por SARS-CoV-2, assim como, sua influência sobre a identificação de outros potenciais biomarcadores de prognóstico.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar e quantificar os níveis séricos de IL-6 em pacientes COVID-19 graves; Investigar a relação entre os níveis de IL-6 e de outras citocinas inflamatórias (IL-8, IL-10, IFN, e TNF) e quimiocinas (CCL2, CCL5, CXCL9 e CXCL10);

- Correlacionar os níveis de IL-6 com marcadores séricos ambulatoriais de severidade (PCR, LDH, ferritina, D- dímero) e dano pulmonar.
- Avaliar a associação dos níveis séricos de IL-6 e óbito.

4 JUSTIFICATIVA

No Brasil, em 24 de fevereiro de 2023, existiam mais de 135 mil casos de COVID-19 em acompanhamento (BRASIL, 2023). Ainda que haja progressão da cobertura vacinal, são registrados novos casos diariamente de COVID-19, além disso, há possibilidade do aparecimento de novas cepas com potencial patogênico, para o desenvolvimento de novas ondas de infecções. Tendo em vista que ainda não foi totalmente esclarecido como a resposta imune frente a infecção por SARS-CoV-2 funciona, a compreensão do papel de IL-6, importante mediador da resposta imune, com influência sobre ações anti-inflamatórias e pró-inflamatórias, pode ser crucial para entender o agravamento dos casos de COVID-19 e seu prognóstico. No presente estudo, pretende-se por meio da análise dos níveis séricos de IL-6 com cruzamento de dados de severidade da doença, esclarecer o papel desta citocina como um preditor de severidade das infecções por SARS-CoV-2. Bem como identificação de outros possíveis biomarcadores através da estratificação de casos graves de COVID-19 que apresentaram concentrações de IL-6 séricas baixas, médias, intermediárias e altas.

5 METODOLOGIA

5.1 Desenho do Estudo

O presente estudo é um estudo de coorte retrospectivo, no qual foram incluídos no estudo 36 amostras coletadas e armazenadas no banco de amostras do Instituto Keizo Asami sob responsabilidade do Prof.Dr. Fabrício O. Souto. As amostras compreendem soro e plasma pacientes COVID-19 graves com idade entre 29 a 88 anos, coletados durante o ano de 2020, confirmados por testes moleculares

e/ou sorológicos. Todos os pacientes incluídos tiveram necessidade de ventilação mecânica invasiva. Desses, 20 vieram a óbito, e 16 tiveram alta hospitalar. Foi realizada a dosagem de citocinas por meio de citometria de fluxo e a estratificação dos pacientes pelos níveis de IL-6 (baixo: 0 a 30 pg/ml; médio 31 a 200 pg/ml; intermediário: 201 a 999 pg/ml; e alto: > 1000 pg/ml). Após a estratificação, foram correlacionados os níveis de IL-6 e de outras citocinas inflamatórias (IL-8, IL-10) e quimiocinas (CCL2, CCL5, CXCL9, CXCL10); Os níveis de IL-6 com marcadores séricos ambulatoriais de severidade (PCR, LDH, ferritina).

5.2 Coleta de dados

Em uma tabela do excel foram tabulados os seguintes dados: ferritina, D-dímero, Lactato desidrogenase (LDH), proteína C reativa (PCR). Assim como, contagem de leucócitos em sangue total e tomografia pulmonar. Retirados de prontuários devidamente numerados, contendo os dados acima mencionados e identificação dos pacientes. Obtido dos serviços de saúde: Sitário Lauro Wanderley - Universidade Federal da Paraíba (HULWUFPB) em João Pessoa, Hospital Alberto Urquiza Wanderley de João Pessoa, Hospital Clementino Fraga em João Pessoa e o Hospital de Emergência e Trauma Dom Luís Gonzaga Fernandes de Campina Grande.

5.3 Dosagem das Citocinas por CBA

Foi feita a caracterização dos principais mediadores inflamatórios e marcadores celulares envolvidos na inflamação. Perfil de citocinas dos padrão Th1/Th2/Th17 (#560484, BD Biosciences), quimiocinas (CXCL8, CCL5, CXCL9, CCL2, CXCL10; #552990, BD Biosciences). Após as respectivas marcações as amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo (Accuri C6 CSampler (BD Biosciences©) e os dados obtidos foram analisados com software FCAP Array™ (BD Biosciences). Para definir os pontos de corte usamos com base o artigo "*IL-6 serum levels predict severity and response to tocilizumab in COVID-19: An observational study*" onde IL-6 acima de 30 pg/mL foi associada a maior necessidade de ventilação mecânica invasiva, no entanto, para melhor caracterizar os grupos adicionamos outros níveis de estratificação.

5.4 Análise estatística

As análises foram realizadas através do *software GraphPad Prism 9.0 Windows®*. A comparação entre os grupos foi feita usando *one-way ANOVA*, pós teste de Tukey, considerando $p \leq 0.05$. No mais, para as análises de correlação foi usado o coeficiente de correlação de Pearson ($p \leq 0.05$). Por fim, para análise de variáveis categóricas foi usado regressão logística simples.

5.5 Aspectos éticos

O presente projeto está vinculado ao projeto aprovado e licenciado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep CAAE 30658920.4.0000.000

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos da infecção por SARS-CoV-2 na saúde do hospedeiro são complexos e variações são observadas na gravidade da doença. O presente estudo foi desenvolvido para melhor compreender o papel da IL-6, um mediador importante das respostas imunes frente a COVID-19 (LIU et al., 2019). Os 36 pacientes desta coorte após quantificação das concentrações séricas de IL-6 foram estratificados em 4 grupos: IL-6 baixa (n= 8) 0 a 30 pg/ml; média (n= 14) 31 a 200 pg/ml; intermediária (n= 7) 201 a 999 pg/ml; e alta (n= 7) > 1000 pg/ml (Tabela 2).

Tabela 2: estratificação de pacientes COVID-19 grave baseado na concentração de IL-6

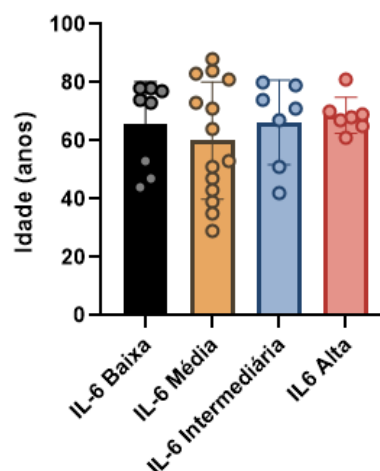
IL-6			
Baixa	Média	Intermediária	Alta
n = 8	n = 14	n = 7	n = 7
2,17	30,25	250,82	1.194,69
6,35	30,36	286,01	1.318,75
8,68	42,92	320,83	3.104,69
11,76	48,41	353,27	3.894,35
12,43	67,18	439,99	6.895,21

20,89	70,42	587,19	7.041,75
21,39	137,95	700,61	38.747,88
22,57	141,34		
	145,29		
	156,62		
	172,07		
	175,17		
	190,26		
	193,94		

Fonte: autora.

A idade já foi relatada como uma associação negativa com a eliminação viral, ou seja, a idade avançada causa o prolongamento da eliminação viral, isso poderia decorrer de efeitos dependentes da idade nas funções de células T e B (XUE et al., 2020). Diante disso, avaliamos os grupos de IL-6, que, quando comparados entre si não apresentaram diferença estatística quanto a idade: IL-6 Alta vs Baixa ($P = 0,6549$), IL-6 Alta vs Média ($P = 0,9891$), IL-6 Alta vs Intermediária ($P = 0,9920$) (Figura 3). Assim, observamos que a idade não influencia na elevação das concentrações séricas de IL-6.

Figura 3: Média de idade dos pacientes estratificados pelas concentrações de IL-6

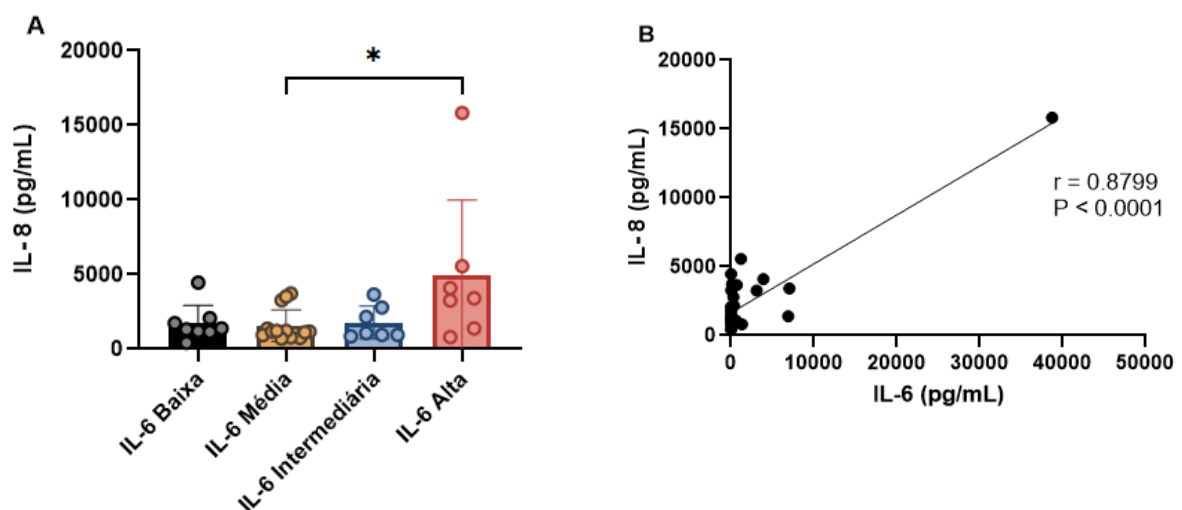


fonte: autora.

Legenda: Gráfico de barras, idade pacientes COVID-19 grave estratificados em IL-6 Baixa, Média, Intermediária e Alta.

Após a estratificação analisamos se as concentrações de IL-6 estavam relacionadas com alterações nas concentrações de outras proteínas. Observamos que as concentrações de IL-8 também estavam elevadas nos pacientes que apresentaram IL-6 alta quando comparadas com IL-6 média (Figura 4A). IL-8 é uma citocina pró-inflamatória, quimioatraente de neutrófilos, que pode induzir outras citocinas pró-inflamatórias enquanto diminui as anti-inflamatórias, contribuindo para um quadro de hiperinflação observado na COVID-19 (YIU; GRAHAM; STENGEL, 2012; BERNHARD et al., 2021; RAMASAMY; SUBBIAN, 2021). Para melhor esclarecer a relação entre as concentrações de IL-6 e IL-8 foi realizado teste de Correlação de Pearson, neste caso, apresentando uma correlação entre as duas variáveis ($P < 0.0001$; $r = 0.8789$) (Figura 4 B). Esse resultado sugere fortemente que as concentrações de IL-6 altas influenciam no aumento da concentração de IL-8.

Figura 4: Concentração de IL-8 em pacientes COVID-19 grave.



Fonte: autora

Legenda: (A) Concentração de IL-8 nos pacientes COVID-19 estratificados em grupos de IL-6 baixa, média, intermediária e alta. Com diferença estatística entre os grupos IL-6 Média vs. IL-6 Alta ($P = 0.0269$) (B) teste de Pearson para avaliar correlação entre IL-6 e IL-8, correlação positiva com $P < 0.0001$, $r = 0.8799$. * $P \leq 0,05$

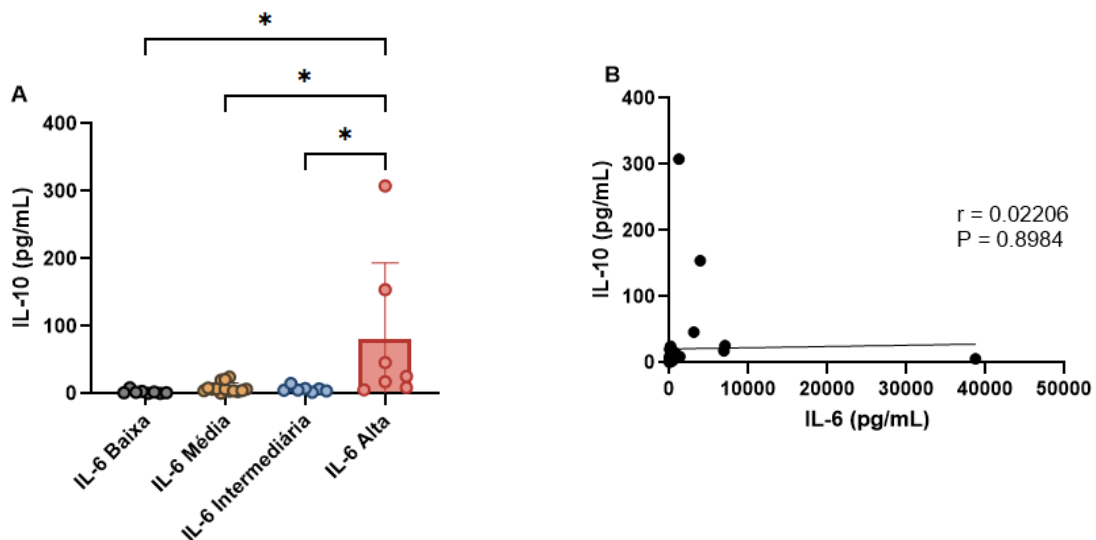
IL-10 também mostrou-se elevada nos pacientes IL-6 alta quando comparados aos pacientes IL-6 Baixa ($P = 0.0204$), Média ($P = 0.0163$) e Intermediária ($P = 0.0375$), apresentando significância estatística entre os grupos (Figura 5 A). IL-10 é uma citocina com atividade anti-inflamatória (CRAYNE et al., 2019). Além disso, a IL-10 foi citada como preditor de gravidade na COVID-19. Quando comparados grupos saudáveis e pacientes com COVID-19 graves, IL-10

estava significativamente aumentada nos pacientes graves (LUCAS et al., 2020; LAING et al., 2020; HAN et al., 2020). IL-10 também pode amplificar a hiperinflamação relacionada à sepse viral observada em alguns pacientes com COVID-19 graves/criticamente doentes (LAING et al., 2020).

No mais, ABERS et al., (2021) relataram que em modelos de camundongos, as células T reguladoras produtoras de IL-10 desempenhavam um papel importante no controle da inflamação pulmonar, restringindo o desenvolvimento de células Th17 que danificam os tecidos e inibindo as respostas inflamatórias inatas. Ademais, relataram níveis mais altos de IL-10 em pacientes com COVID-19 que morreram. Esse aumento na concentração de IL-10 pode estar relacionado a uma tentativa do sistema imune em controlar a hiperinflamação encontrada nesses pacientes.

Em nosso estudo, as citocinas IFN γ , IL-2, IL-17 não foram detectadas em concentrações dentro da curva padrão destas proteínas no ensaio, mesmo utilizando amostras sem diluição. Não observamos correlação entre as variáveis IL-10 e IL-6 ($P = 0.8984$, $r = 0.00206$) (Figura 5 B).

Figura 5: Concentração de IL-10 em pacientes COVID-19 grave.



Fonte: autora.

Legenda: (A) Concentração sérica de IL-10 em pacientes COVID-19 graves estratificados em grupos baseados na quantificação de IL-6. Com diferença estatística entre IL-6 Alta vs. IL-6 Baixa ($P = 0.0204$), IL-6 Alta vs. IL-6 Média ($P = 0.0163$), IL-6 Alta vs. IL-6 Intermediária ($P = 0.0375$). (B) Teste de Pearson para análise de correlação entre as variáveis ($P = 0.9121$, $r = 0.01907$). * $P \leq 0,05$.

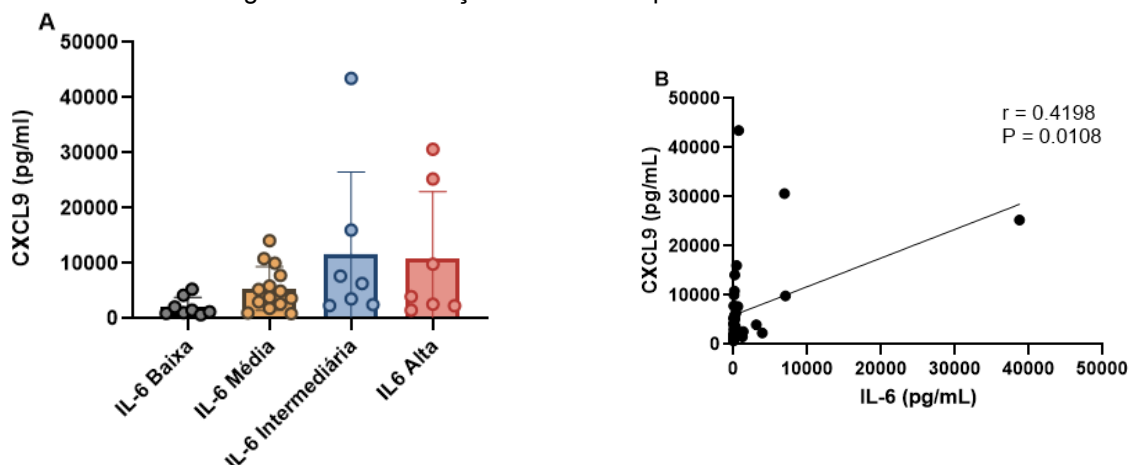
Quimiocinas são moléculas de recrutamento, isto é, recrutam células de defesa para os locais de infecção em resposta a um estímulo químico (SINGH; ANSHITA; RAVICHANDIRAN, 2021). Altas concentrações de quimiocinas foram

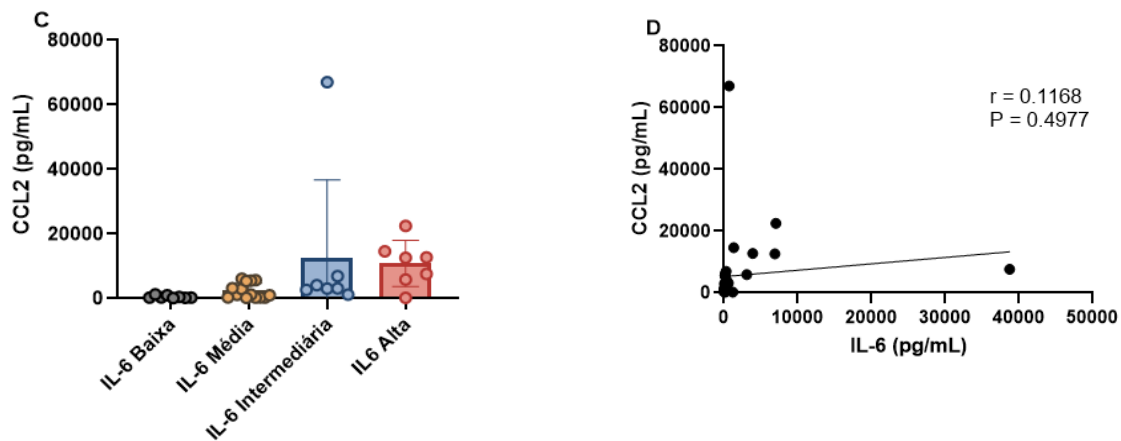
detectadas em todos os pacientes presentes no estudo. Não observamos alterações no padrão de CCL5 (Figura 11 A). As concentrações de CXCL9 (quimioatraente de células T) estão elevadas nos pacientes do grupo IL-6 intermediária e alta (Figura 6 A), apresentando correlação de Pearson positiva entre CXCL9 e IL-6 ($P = 0.0108$, $r = 0.4198$) (Figuras 6 B).

Outras citocinas como CCL2 (quimioatraente de monócito 1), também já foi implicada na patologia da COVID-19, entre as fontes primárias estão células epiteliais, células endoteliais, monócitos/macrófagos. Há o direcionamento da migração e infiltração de monócitos, linfócitos T de memória para local da lesão e infecção em vários distúrbios, promovendo a inflamação. Além disso, apresenta atividade reguladora na polarização das células Th0 em direção a um fenótipo Th2. Podendo modular a resposta imune Th1 de forma a suprimir a diferenciação de células T virgens em células efetoras Th1 regulando a capacidade de liberação de IL-12 de células dendríticas.

Vale mencionar, que CCL2 apresentou papel crítico no recrutamento de macrófagos produtores de TNF- α para os pulmões de animais infectados com influenza, resultando em edema pulmonar, hemorragia nos brônquios e apoptose de células epiteliais dos pulmões (SINGH; ANSHITA; RAVICHANDIRAN, 2021). Na COVID-19, além do envolvimento com o recrutamento de células imunes para o local da infecção está envolvida na disfunção endotelial (HAN et al., 2020). Em nossos achados CCL2 pareceu elevada nos grupos IL-6 intermediária e alta, no entanto, não foi encontrada significância estatística entre os grupos (IL-6 Alta vs. IL-6 Intermediária $P = 0.9910$) (Figura 6 C), nem correlação entre as duas variáveis (CCL2 e IL-6) ($P = 0.4977$ $r = 0.1168$). (Figura 6 D)

Figura 6: Concentração sérica das quimiocinas CXCL9 e CCL2





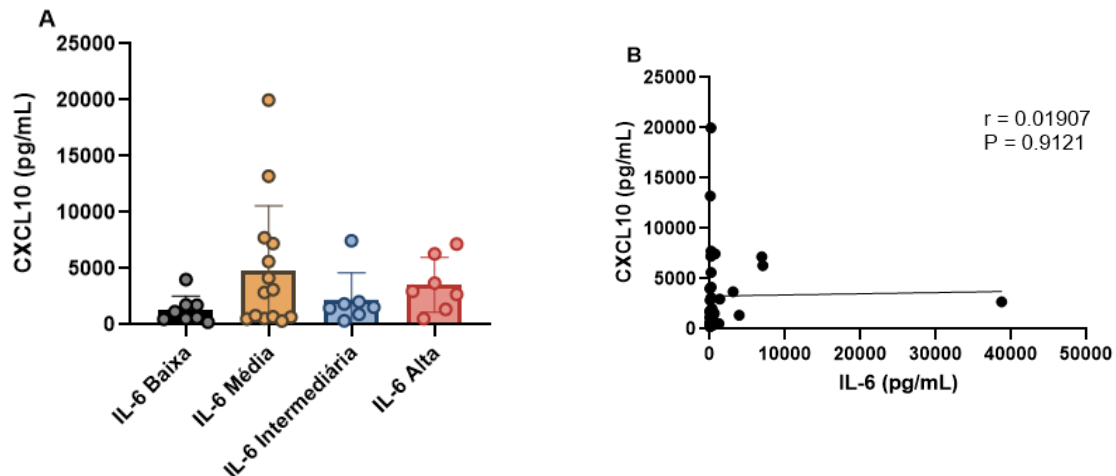
Fonte: autora.

Legenda: análise estatística entre IL-6 e CXCL9 (A) e CCL2 (C) em pacientes COVID-19 grave. Correlações de Pearson positiva entre IL-6 e CXCL9 ($P = 0.0108$, $r = 0.4198$) (B). Análise de correlação entre IL-6 e CCL2 ($P = 0.4977$, $r = 0.1168$) (D).

ABERS et al.(2021) demonstraram que pacientes COVID-19 que necessitam de internação na UTI apresentam níveis plasmáticos anormais de citocinas e quimiocinas, incluindo CXCL10 (quimiocina induzível por IFN) e CCL2. Neste mesmo estudo, foi relatado que os pacientes com COVID-19 que vieram a óbito apresentavam níveis de CXCL10 mais elevados em comparação aos pacientes que apresentaram doença moderada.

Macrófagos inflamatórios foram encontrados de forma predominante no lavado broncoalveolar de pacientes com COVID-19 grave. Foi observado que essas células distinguem-se por níveis altos de CCL2, NFKB1, CXCL10, e entre outras (ARUNACHALAM et al., 2020). Vale ressaltar que CXCL10 é um fator antiviral importante em infecções do trato respiratório, e em numerosas infecções virais, foi relatado que os níveis aumentados de CXCL10, tanto plasmático quando no lavado broncoalveolar, estavam associados a gravidade da doença (TIWARI et al., 2023). Em nosso estudo, no entanto, não foi possível observar significância estatística entre nenhum dos grupos (IL-6 Alta vs. IL-6 Baixa $P = 0.7053$; IL-6 Alta vs. Intermediária $P = 0.9276$; IL-6 Alta vs. IL-6 Média $P = 0.89994$) (Figura 7 A), além disso, não observamos correlação entre CXCL10 e IL-6 ($P = 0.9121$, $r = 0.01907$) (Figura 7 B). Sugerindo que apesar da relação que esses mediadores apresentam com as infecções virais eles não apresentam co-dependência, podendo isso ser consequência dos processos regulatórios envolvidos com cada mediador inflamatório.

Figura 7: Concentrações séricas de CXCL10

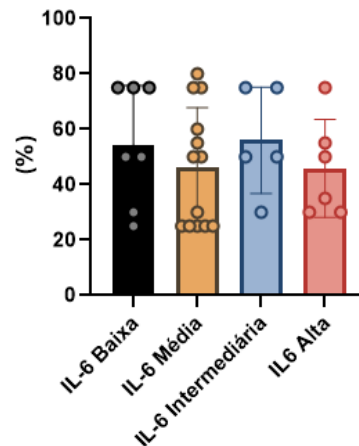


Fonte: autora

Legenda: análise estatística entre níveis de IL-6 e CXCL10 em pacientes COVID-19 grave (A). Correlações de Pearson entre IL-6 e CXCL10 (B). Não foram observadas diferenças estatísticas.

É plausível que a desregulação dos níveis de citocinas e quimiocinas tenham um papel central na imunopatologia da COVID-19. Tendo em vista que os pulmão dos pacientes graves apresentam infiltrado, consequentemente, uma resposta hiperinflamatória é formada (SILVA et al., 2022). XU et al., (2020) em seu estudo com dados de sequenciamento de células únicas (scRNA-seq), observou que monócitos-macrófagos do lavado broncoalveolar (LBA) expressavam níveis mais altos de citocinas e quimiocinas, especialmente em pacientes graves com COVID-19. No mais, um outro estudo, também observou uma maior frequência de macrófagos derivados de monócitos no LBA em pacientes graves, além disso, IL6 , TNF e quimiocinas, entre elas CCL2, foram expressos em níveis mais altos em macrófagos pulmonares de pacientes com infecção grave por COVID-19. Também foi possível observar diferenças entre os níveis de CXCL9 , CXCL10 e CXCL11 entre grupos de pacientes COVID-19 e saudáveis (LIAO et al., 2020). Esses achados sugerem um microambiente pulmonar altamente pró-inflamatório nos pacientes COVID-19 grave. Em nossa coorte não foi possível observar diferenças no comprometimento pulmonar entre os grupos (Figura 8). Mostrando que as concentrações de IL-6 não são determinadas somente pelo padrão de acometimento pulmonar. Em conjunto, esse resultado sugere que a gravidade da COVID-19 envolve outras proteínas sistêmicas. No entanto, para melhor esclarecer a relação dessas proteínas com a gravidade da COVID-19 outras análises ainda são necessárias para que seja possível identificar proteínas diferencialmente expressas.

Figura 8: concentrações de IL-6 vs. dano pulmonar (% de acometimento)

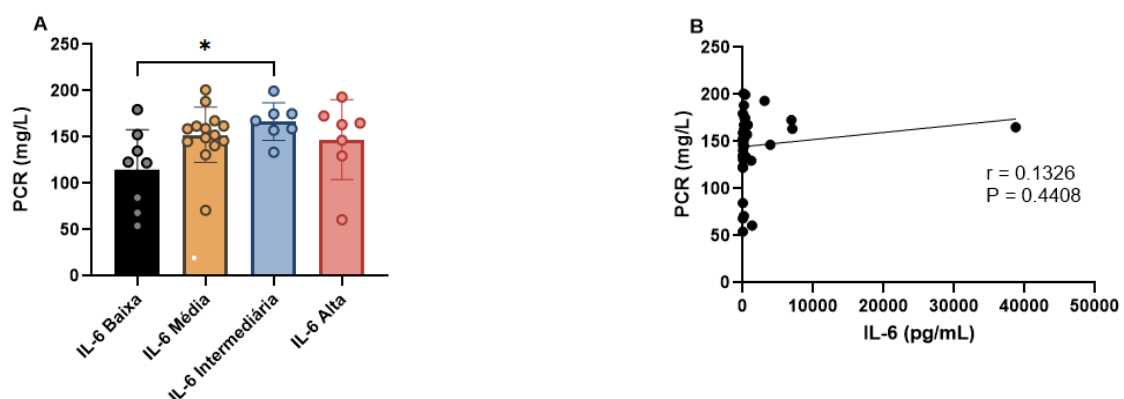


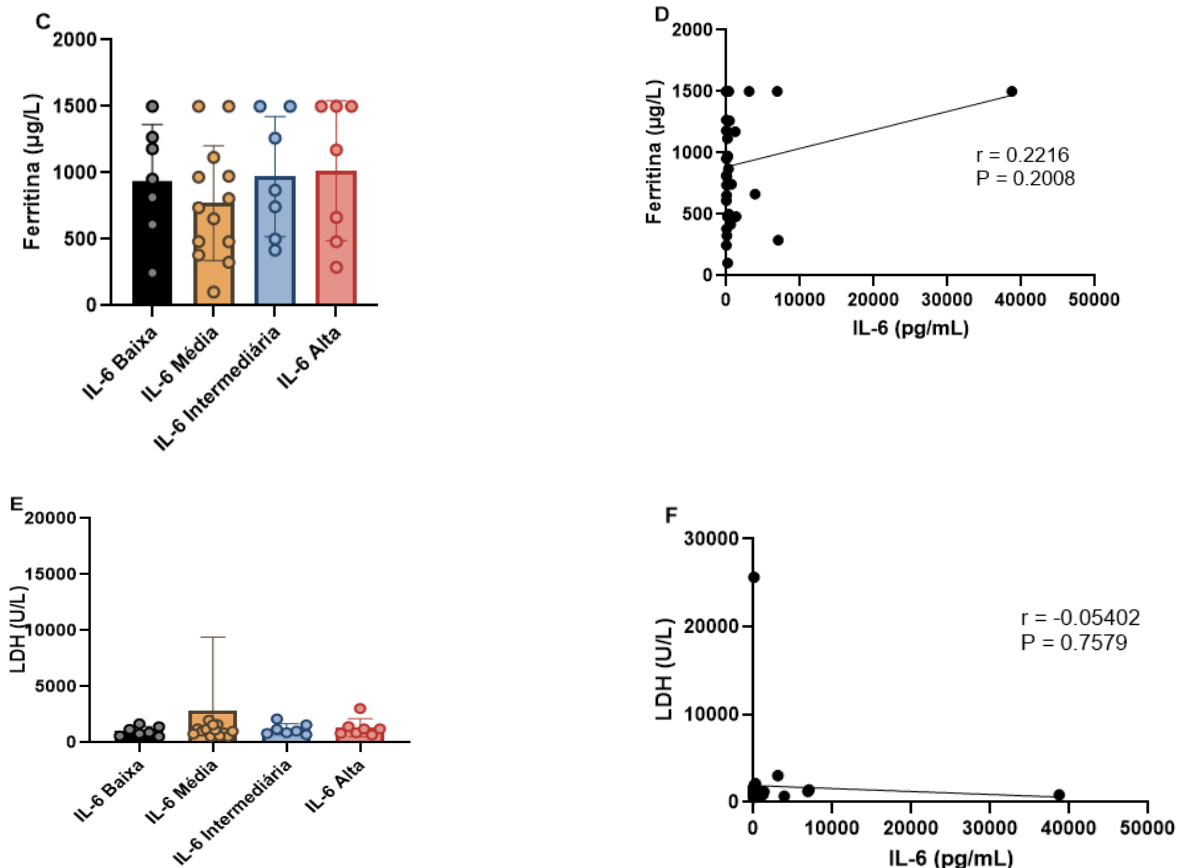
Fonte: autora.

Legenda: análise do comprometimento pulmonar baseado em dados de tomografia estratificados em grupos IL-6 Baixa, Média, Intermediária e Alta.

Analizamos as concentrações séricas de PCR e observamos diferença estatística entre os grupos IL-6 baixa vs. IL-6 intermediária ($P = 0.0322$) (Figura 9 A), mas não com IL-6 alta. As concentrações de outros marcadores inflamatórios como Ferritina e LDH não estavam alteradas, mantendo o mesmo padrão de aumento entre os grupos (Figura 9 C e E). Em contrapartida a outros estudos que fizeram associações entre esses marcadores e o prognóstico: níveis mais altos em não sobreviventes (HAFEZ, 2022) e a um atraso na eliminação viral (XUE et al., 2020). Nosso estudo analisou a correlação entre IL-6 alta e concentrações dessas proteínas, que podem não estar relacionadas com o aumento das concentrações de IL-6 em todos os pacientes (Figura 9 B, D e F). Essa diferença de dados pode estar relacionada ao número de pacientes incluídos no estudo.

Figura 9: Mediadores inflamatórios em pacientes COVID-19 grave





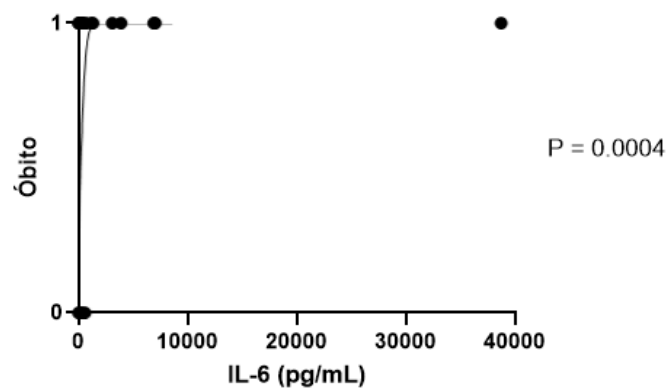
Fonte: autora.

Legenda: análise estatística entre os níveis séricos de PCR (A), ferritina (C) e LDH (E) em pacientes estratificados em IL-6 Baixa, Média, Intermediária e Alta. Diferença estatística entre IL-6 Baixa e IL-6 Intermediária ($P = 0,0322$). Correlação de Pearson entre IL-6 e PCR (B), ferritina (D) e LDH (F). * $P \leq 0,05$

IL-6 é multifacetada e foi descrita em diversos artigos como mediador chave do agravamento da COVID-19 (ZENG et al., 2020; VÁLYI-NAGY et al., 2022; CHEN et al., 2021). Nossos dados corroboram com os esses achados dos 36 pacientes incluídos nessa coorte, todos que foram classificados com IL-6 alta foram a óbito ($n = 7$), enquanto o grupo IL-6 baixa apenas 1 paciente não sobreviveu ($n = 8$) apresentando uma significância estatística entre os grupos IL-6 Alta vs. IL-6 Baixa ($P = 0.0025$). Quando submetidos ao teste de regressão logística simples, observamos associação entre IL-6 e óbito ($P = 0.0004$) (Figura 10). No entanto, IL-6 já foi descrita como importante para os processos de eliminação viral, inclusive, podendo suprimir a reativação viral, proteger contra superinfecção e facilitar remodelação pulmonar após lesão viral (KANG et al., 2020; LAUDER et al., 2013). Além disso, o direcionamento de IL-6 nos pacientes de alto risco pode representar uma melhora no

desfecho da COVID-19 (HEFEZ,2022). Dessa forma, os papéis desempenhados por IL-6 são importantes para o funcionamento adequado das respostas imunes, no entanto a liberação excessiva é consideravelmente importante para exacerbação da resposta imune. Demonstrando um bom potencial para seu uso como marcador de prognóstico. Além disso, a elevação de IL-6 pode estar relacionada ao aumento de outras proteínas nesses pacientes que progridem para óbito.

Figura 10: gráfico de correlação entre IL-6 e óbito.

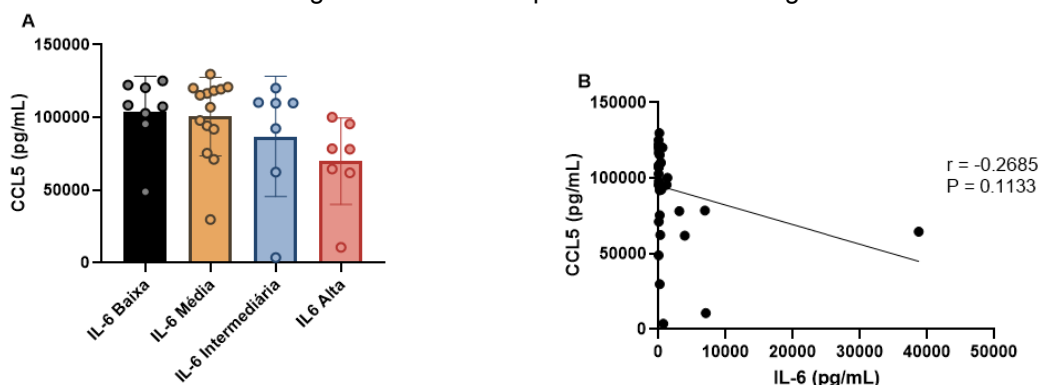


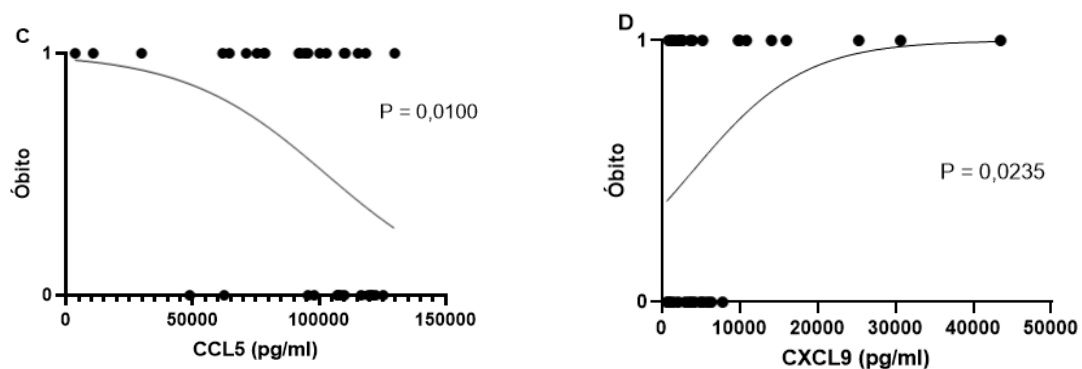
Fonte: autora.

Legenda: Teste de regressão logística simples entre os níveis séricos de IL-6 e óbito ($P = 0.0004$).

Apesar de não termos observado alterações no padrão de CCL5 nos pacientes IL-6 alta em comparação com os outros grupos (IL-6 Baixa $P = 0.2058$, IL-6 média $P = 0.1968$, IL-6 Intermediária $P = 0.8818$) (Figura 11 A e B), a análise de regressão logística simples entre CCL5 e óbito mostrou associação (Figura 11 C) ($P = 0.0100$), assim como, CXCL9 e óbito ($P = 0.0235$) (Figura 11 D). Observamos que o único paciente que veio a óbito no grupo IL-6 baixa, apresentava concentrações elevadas de CCL5, bem como nos outros 3 grupos. Esse dado sugere que a CCL5 pode ser um marcador de progressão da doença em pacientes com IL-6 Baixa, mas em estado grave.

Figura 11: CCL5 em pacientes COVID-19 grave





Fonte: autora.

Legenda: análise estatística entre níveis de IL-6 e CCL5 em pacientes COVID-19 graves subdivididos em grupos baseado no nível sérico de IL-6 (A). Correlações de Pearson entre IL-6 e CCL5 (B); Regressão logística simples entre CCL5 e óbito ($P = 0.0100$) e CXCL9 e óbito ($P = 0.0235$).

7 CONCLUSÃO

Indivíduos COVID-19 grave, em ventilação mecânica, apresentam uma resposta multifacetada e nem todos os pacientes apresentam concentrações de IL-6 alta. Neste trabalho, observamos que concentrações elevadas de IL-6 se correlacionam com concentrações elevadas de IL-8 e CXCL9. Assim como, concentrações elevadas IL-6, CCL5 e CXCL9 estão associadas com desfecho de óbito. De fato, IL-6 parece estar associada a um pior prognóstico. Análises de proteômica no soro precisam ser finalizadas para avaliarmos se existem proteínas diferencialmente alteradas nos pacientes que apresentam diferentes concentrações de IL-6 (Baixa, Média, Intermediária e Alta) que evoluíram para óbito e para identificação de biomarcadores mais sensíveis de progressão.

REFERÊNCIAS

Abbas, Abul k.; Lichtman, Andrew H.; Pillai, Shiv. e *Imunologia Celular e Molecular*. 8ª edição. 8. ed. - Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

ABERS, M. S. et al. An immune-based biomarker signature is associated with mortality in COVID-19 patients. *JCI Insight*, v. 6, n. 1, p. e144455, 11 jan. 2021.

ARUNACHALAM, P. S. et al. Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. *Science*, v. 369, n. 6508, p. 1210–1220, 4 set. 2020.

BARAN, P. et al. The balance of interleukin (IL)-6, IL-6·soluble IL-6 receptor (sIL-6R), and IL-6·sIL-6R·sgp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling. *Journal of Biological Chemistry*, v. 293, n. 18, p. 6762–6775, maio 2018.

BERNHARD, S. et al. Interleukin 8 Elicits Rapid Physiological Changes in Neutrophils That Are Altered by Inflammatory Conditions. *Journal of Innate Immunity*, v. 13, n. 4, p. 225–241, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2020. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/ultimas-noticias-cns/1042-brasil-confirma-primeiro-caso-do-novo-coronavirus-porem-nao-ha-motivo-para-panico>, Acesso em: 15 de mar. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS/MS). Boletim Epidemiológico Diário. Brasília: Ministério da Saúde, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/covid-19/2020/apresenta-o-coletivo-11-04-2020-17h.pdf/view>, Acesso em: 10 de mar. de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS/MS). Coronavírus Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2020. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>, Acesso em: 01 de abr. 2023.

BÖTTCHER, J. P. et al. IL-6 trans-Signaling-Dependent Rapid Development of Cytotoxic CD8⁺ T Cell Function. *Cell Reports*, v. 8, n. 5, p. 1318–1327, set. 2014.

BURIONI, R.; TOPOL, E. J. Assessing the human immune response to SARS-CoV-2 variants. *Nature Medicine*, v. 27, n. 4, p. 571–572, abr. 2021.

CANZIANI, L. M. et al. Interleukin-6 receptor blocking with intravenous tocilizumab in COVID-19 severe acute respiratory distress syndrome: A retrospective case-control survival analysis of 128 patients. *Journal of Autoimmunity*, v. 114, p. 102511, nov. 2020.

CAPRA, R. et al. Impact of low dose tocilizumab on mortality rate in patients with COVID-19 related pneumonia. *European Journal of Internal Medicine*, v. 76, p. 31–35, jun. 2020.

CHANNAPPANAVAR, R.; PERLMAN, S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Seminars in Immunopathology*, v. 39, n. 5, p. 529–539, jul. 2017.

CHEN, Y. et al. Aging in COVID-19: Vulnerability, immunity and intervention. *Ageing Research Reviews*, v. 65, p. 101205, jan. 2021.

CRAYNE, C. B. et al. The Immunology of Macrophage Activation Syndrome. *Frontiers in Immunology*, v. 10, p. 119, 1 fev. 2019.

CODO, A. C. et al. Elevated Glucose Levels Favor SARS-CoV-2 Infection and Monocyte Response through a HIF-1 α /Glycolysis-Dependent Axis. *Cell Metabolism*, v. 32, n. 3, p. 437- 446.e5, set. 2020.

CHOY, E. H. et al. Translating IL-6 biology into effective treatments. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 16, n. 6, p. 335–345, jun. 2020.

DIAMOND, M. S.; KANNEGANTI, T.-D. Innate immunity: the first line of defense

against SARS-CoV-2. *Nature Immunology*, v. 23, n. 2, p. 165–176, fev. 2022.

DEL VALLE, D. M. et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nature Medicine*, v. 26, n. 10, p. 1636–1643, out. 2020.

FAJGENBAUM, D. C.; JUNE, C. H. Cytokine Storm. *New England Journal of Medicine*, v. 383, n. 23, p. 2255–2273, 3 dez. 2020.

GALVÁN-ROMÁN, J. M. et al. IL-6 serum levels predict severity and response to tocilizumab in COVID-19: An observational study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 147, n. 1, p. 72–80.e8, jan. 2021.

GUBERNATOROVA, E. O. et al. IL-6: Relevance for immunopathology of SARS-CoV-2. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 53, p. 13–24, jun. 2020.

HAFEZ, W. Demographic and clinical factors affecting serum IL-6, and its correlation with the severity, and mortality of COVID-19. *Medicine in Microecology*, v. 14, p. 100068, dez. 2022.

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

HU, B. et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, v. 19, n. 3, p. 141–154, mar. 2021.

ISLAMUDDIN, M. et al. Innate Immune Response and Inflammasome Activation During SARS-CoV-2 Infection. **Inflammation**, v. 45, n. 5, p. 1849–1863, out. 2022.

KADAM, S. B. et al. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *Journal of Basic Microbiology*, v. 61, n. 3, p. 180–202, mar. 2021.

KANG, S. et al. IL-6 trans-signaling induces plasminogen activator inhibitor-1 from vascular endothelial cells in cytokine release syndrome. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences, v. 117, n. 36, p. 22351–22356, 8 set. 2020.

.

KANG, S.; KISHIMOTO, T. Interplay between interleukin-6 signaling and the vascular endothelium in cytokine storms. *Experimental & Molecular Medicine*, v. 53, n. 7, p. 1116–1123, jul. 2021.

KAPTEN, K.; ORCZYK, K.; SMOLEWSKA, E. Immunity in SARS-CoV-2 Infection: Clarity or Mystery? A Broader Perspective in the Third Year of a Worldwide Pandemic. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, v. 71, n. 1, p. 7, dez. 2023.

KAYE, A. G.; SIEGEL, R. The efficacy of IL-6 inhibitor Tocilizumab in reducing severe COVID-19 mortality: a systematic review. *PeerJ*, v. 8, p. e10322, 2 nov. 2020.

KIRTIPAL, N.; BHARADWAJ, S.; KANG, S. G. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 85, p. 104502, nov. 2020.

LAING, A. G. et al. A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nature Medicine*, v. 26, n. 10, p. 1623–1635, 1 out. 2020.

LAGUNA-GOYA, R. et al. IL-6–based mortality risk model for hospitalized patients with COVID-19. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 146, n. 4, p. 799–807.e9, out. 2020.

LAUDER, S. N. et al. Interleukin-6 limits influenza-induced inflammation and protects against fatal lung pathology: Immunity to infection. *European Journal of Immunology*, v. 43, n. 10, p. 2613–2625, out. 2013.

LIAO, M. et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nature Medicine*, v. 26, n. 6, p. 842–844, jun. 2020

LIU, T. et al. The role of interleukin-6 in monitoring severe case of coronavirus disease 2019. *EMBO Molecular Medicine*, v. 12, n. 7, 7 jul. 2020.

LIU, B. et al. Can we use interleukin-6 (IL-6) blockade for coronavirus disease 2019 (COVID-19)-induced cytokine release syndrome (CRS)? *Journal of Autoimmunity*, v. 111, p. 102452, jul. 2020.

LUCAS, C. et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*, v. 584, n. 7821, p. 463–469, 20 ago. 2020.

MALLAPATY, S. COVID-origins study links raccoon dogs to Wuhan market: what scientists think. *Nature*, v. 615, n. 7954, p. 771–772, 30 mar. 2023.

MISTRY, P. et al. SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 809244, 3 jan. 2022.

MOORE, J. B.; JUNE, C. H. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science*, v. 368, n. 6490, p. 473–474, maio 2020.

MURALIDAR, S. et al. The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2. *Biochimie*, v. 179, p. 85–100, dez. 2020.

NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. The Two-Faced Cytokine IL-6 in Host Defense and Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 11, p. 3528, 9 nov. 2018.

OPAS. Organização Pan-Americana de Saúde. Variantes de vírus são esperadas, mas vigilância deve continuar monitorando possíveis mudanças nos padrões clínicos, dizem especialistas. Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2021. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/14-5-2021-variantes-virus-sao-esperadas-mas-vigilancia-deve-continuar-monitorando>. Acesso em: 15 de mar. de 2023.

PITKÄNEN, A. et al. Epilepsy biomarkers – Toward etiology and pathology specificity. *Neurobiology of Disease*, v. 123, p. 42–58, mar. 2019.

QUARTUCCIO, L. et al. Higher levels of IL-6 early after tocilizumab distinguish survivors from nonsurvivors in COVID-19 pneumonia: A possible indication for deeper targeting of IL-6. *Journal of Medical Virology*, v. 92, n. 11, p. 2852–2856, nov. 2020.

RAHIMI, A.; MIRZAZADEH, A.; TAVAKOLPOUR, S. Genetics and genomics of SARS-CoV-2: A review of the literature with the special focus on genetic diversity and SARS-CoV-2 genome detection. *Genomics*, v. 113, n. 1, p. 1221–1232, jan. 2021

ROMANO, M. et al. A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. *Cells*, v. 9, n. 5, p. 1267, 20 maio 2020.

RAMASAMY, S.; SUBBIAN, S. Critical Determinants of Cytokine Storm and Type I Interferon Response in COVID-19 Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 34, n. 3, p. e00299-20, 16 jun. 2021.

SANTA CRUZ, A. et al. Interleukin-6 Is a Biomarker for the Development of Fatal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Pneumonia. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 613422, 18 fev. 2021.

SANDQUIST, M.; WONG, H. R. Biomarkers of sepsis and their potential value in diagnosis, prognosis and treatment. *Expert Review of Clinical Immunology*, v. 10, n. 10, p. 1349–1356, out. 2014.

SCOVINO, A. M. et al. SARS-CoV-2's Variants of Concern: A Brief Characterization. *Frontiers in Immunology*, v. 13, p. 834098, 26 jul. 2022.

SILVA, M. J. A. et al. Innate immunity to SARS-CoV-2 infection: a review. *Epidemiology and Infection*, v. 150, p. e142, 2022.

SINGH, S.; ANSHITA, D.; RAVICHANDIRAN, V. MCP-1: Function, regulation, and

involvement in disease. *International Immunopharmacology*, v. 101, p. 107598, dez. 2021.

SOMERS, E. C. et al. Tocilizumab for Treatment of Mechanically Ventilated Patients With COVID-19. *Clinical Infectious Diseases*, v. 73, n. 2, p. e445–e454, 15 jul. 2021

TAO, K. et al. The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nature Reviews Genetics*, v. 22, n. 12, p. 757–773, dez. 2021.

TIWARI, V. et al. Dynamic Changes in Circulatory Cytokines and Chemokines Levels in Mild to Severe COVID-19 Patients. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, v. 38, n. 2, p. 212–219, abr. 2023.

UNVER, N.; MCALLISTER, F. IL-6 family cytokines: Key inflammatory mediators as biomarkers and potential therapeutic targets. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 41, p. 10–17, jun. 2018.

VALDÉS, A. et al. Metabolomics study of COVID-19 patients in four different clinical stages. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, p. 1650, 31 jan. 2022.

VÁLYI-NAGY, I. et al. Adaptive Immunity to Viruses: What Did We Learn from SARS-CoV-2 Infection? *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 22, p. 13951, 12 nov. 2022.

XU, G. et al. The differential immune responses to COVID-19 in peripheral and lung revealed by single-cell RNA sequencing. *Cell Discovery*, v. 6, n. 1, p. 73, 20 out. 2020.

XUE, J. et al. Risk factors for prolonged viral clearance in adult patients with COVID-19 in Beijing, China: A prospective observational study. *International Immunopharmacology*, v. 89, p. 107031, dez. 2020.

WANG, Z.; HAN, W. Biomarkers of cytokine release syndrome and neurotoxicity related to CAR-T cell therapy. *Biomarker Research*, v. 6, n. 1, p. 4, dez. 2018.

WIERSINGA, W. J. et al. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA*, v. 324, n. 8, p. 782, 25 ago. 2020.

WHO COVID-19 Dashboard. Geneva: World Health Organization, 2020. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 30 de mar. de 2023.

WHO. World Health Organization. Statement on the update of WHO's working definitions and tracking system for SARS-CoV-2 variants of concern and variants of interest . Geneva: World Health Organization, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/16-03-2023-statement-on-the-update-of-who-s-working-definitions-and-tracking-system-for-sars-cov-2-variants-of-concern-and-variants-of-interest>. Acesso em: 20 de mar. de 2023

WOLF, J. M. et al. Temporal spread and evolution of SARS-CoV-2 in the second pandemic wave in Brazil. *Journal of Medical Virology*, v. 94, n. 3, p. 926–936, mar. 2022.

WU, C. et al. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v. 10, n. 5, p. 766–788, maio 2020.

YANG, H.; RAO, Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nature Reviews Microbiology*, v. 19, n. 11, p. 685–700, nov. 2021.

YIU, H. H.; GRAHAM, A. L.; STENGEL, R. F. Dynamics of a Cytokine Storm. *PLoS ONE*, v. 7, n. 10, p. e45027, 1 out. 2012.

ZENG, F. et al. Association of inflammatory markers with the severity of COVID-19: A meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 96, p. 467–474, jul. 2020.

ZIZZO, G. et al. Immunotherapy of COVID-19: Inside and Beyond IL-6 Signalling. *Frontiers in Immunology*, v. 13, p. 795315, 22 fev. 2022.

ANEXO

Parecer comitê de ética

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA 								
PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP								
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA Título da Pesquisa: SARS-CoV-2 (COVID-19): Uma abordagem clínico-laboratorial, epidemiológica e genética no estado da Paraíba, Brasil Pesquisador: EDUARDO SÉRGIO SOARES SOUSA Área Temática: Genética Humana: (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP); Versão: 2 CAAE: 30658920.4.0000.0008 Instituição Proponente: Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB Patrocinador Principal: Financiamento Próprio								
DADOS DO PARECER Número do Parecer: 4.026.905 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 Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1536274.pdf, de 25/04/2020).								
INTRODUÇÃO Um surto de pneumonia causada por um novo coronavírus, atualmente conhecido como Síndrome Respiratória Aguda Grave do Coronavírus-2 (SARS-CoV-2), ocorreu em Wuhan, província de Hubei na China, em dezembro de 2019 (ZHOU et al. 2020). Neste período, um grupo de indivíduos foi admitido com febre, tosse, falta de ar e outros sintomas (WHO, 2020). Achados em tomografia computadorizada (TC) revelaram um padrão diferenciado de pneumonia com opacidades variadas (mais densas, mais profundas e confluentes) em comparação com imagens de pulmão em indivíduos saudáveis (Al et al, 2020). Através da reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex em tempo real, utilizando painéis de patógenos já conhecidos não foi possível detectar o agente etiológico, sugerindo uma pneumonia de origem até então indeterminada (ZHOU et al. 2020). No dia 10 de janeiro do mesmo ano, amostras obtidas através de lavagem broncoalveolar dos pacientes foram sequenciadas e revelaram um patógeno com sequência genética semelhante à linhagem de								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2">Endereço: SRTVN 701, Via W5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Asa Norte</td> <td>CEP: 70.719-040</td> </tr> <tr> <td>UF: DF</td> <td>Município: BRASÍLIA</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (61)3315-5877</td> <td>E-mail: conep@saude.gov.br</td> </tr> </table>	Endereço: SRTVN 701, Via W5 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
Endereço: SRTVN 701, Via W5 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: 4.026.905

país/responsável legal em linguagem adequada.

RESPOSTA: Não serão mais incluídos no estudo indivíduos com menos de 18 anos.

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_1536274.pdf	25/04/2020 09:01:10		Aceito
Outros	Carta_resposta_24_04_20.pdf	25/04/2020 09:00:15	EDUARDO SÉRGIO SOARES SOUSA	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CONEP_3987972.pdf	25/04/2020 08:55:10	EDUARDO SÉRGIO SOARES SOUSA	Aceito
Outros	TCLE_corrigido_limpo.pdf	25/04/2020 08:54:39	EDUARDO SÉRGIO SOARES SOUSA	Aceito
Outros	COVID_19_respostas_pendencias_CONEP_limpo.pdf	25/04/2020 08:53:07	EDUARDO SÉRGIO SOARES SOUSA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	COVID_19_respostas_pendencias_CONEP.pdf	25/04/2020 08:52:51	EDUARDO SÉRGIO SOARES SOUSA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_corrigido.pdf	25/04/2020 08:50:12	EDUARDO SÉRGIO SOARES SOUSA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rostroassinada.pdf	07/04/2020 10:25:11	EDUARDO SÉRGIO SOARES SOUSA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTAS_ANUENCIA.pdf	06/04/2020 16:57:23	EDUARDO SÉRGIO SOARES SOUSA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	COVID_19_Completo.pdf	06/04/2020 16:52:29	EDUARDO SÉRGIO SOARES SOUSA	Aceito

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, Iota 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: 4.026.905

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)3015-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br