



Universidade Federal do Maranhão
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto
Mestrado Acadêmico



BIOMARCADORES HEMATOLÓGICOS E
INFLAMATÓRIOS NA PREDIÇÃO DE SEVERIDADE DA
COVID-19

ALICE DE SÁ FERREIRA

São Luís
2022

ALICE DE SÁ FERREIRA

**BIOMARCADORES HEMATOLÓGICOS E
INFLAMATÓRIOS NA PREDIÇÃO DE SEVERIDADE DA
COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto

Área de Concentração: Saúde e Metabolismo Humano

Linha de Pesquisa: Alterações Endócrinas

Orientador: Prof^a. Dr^a. Sally Cristina Moutinho Monteiro

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréa Teixeira de Carvalho

Coordenador: Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade

**São Luís
2022**

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

de Sá Ferreira, Alice.

BIOMARCADORES HEMATOLÓGICOS E INFLAMATÓRIOS NA PREDIÇÃO
DE SEVERIDADE DA COVID-19 / Alice de Sá Ferreira. - 2022.
92 p.

Coorientador(a): Andréa Teixeira de Carvalho.

Orientador(a): Sally Cristina Moutinho Monteiro.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
VIDEOCONFERÊNCIA, 2022.

1. Biomarcadores. 2. Citocinas. 3. Coronavírus. 4.
COVID-19. I. Moutinho Monteiro, Sally Cristina. II.
Teixeira de Carvalho, Andréa. III. Título.

ALICE DE SÁ FERREIRA

**BIOMARCADORES HEMATOLÓGICOS E
INFLAMATÓRIOS NA PREDIÇÃO DE SEVERIDADE DA
COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto

A Banca Examinadora da Defesa de Mestrado, apresentada em sessão pública, considerou o candidato aprovado em: ____/____/____.

Prof^a. Dr^a. Sally Cristina Moutinho Monteiro (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a. Andréa Teixeira de Carvalho (Coorientadora)
Instituto de Pesquisa René Rachou (FIOCRUZ-MG)

Elaine Speziali de Faria (Examinadora)
Instituto de Pesquisa René Rachou (FIOCRUZ-MG)

Lilaleia Gonçalves França (Examinadora)
Universidade Federal do Maranhão

Flávia Castello Branco Vidal Cabral (Examinadora)
Universidade Federal do Maranhão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Novo Coronavírus	14
2.2 COVID-19	19
2.3 Diagnóstico da COVID-19	21
2.4 Respostas Inflamatórias e Tempestade de Citocinas	22
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo Geral	26
3.2 Objetivos Específicos	26
4 ARTIGOS	27
4.1 Artigo 01	27
4.2 Artigo 02	45
5 CONCLUSÃO DA DISSERTAÇÃO	58
6 REFERÊNCIAS DA DISSERTAÇÃO	58
APÊNDICE A-TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	67
ANEXO A-PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	72
ANEXO B-AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA-COMIC	81
ANEXO C-REGRAS DA REVISTA-ARTIGO 01	83
ANEXO D-DECLARAÇÃO DE ACEITE ARTIGO 01	88
ANEXO E-REGRAS DA REVISTA DO ARTIGO 02	89

Aos meus pais, Geraldina e Luíz, pelo amor incondicional e todo apoio para que este sonho se realizasse. Gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder e me iluminar sempre.

A minha querida orientadora Prof^a. Dr^a Sally Cristina Moutinho Monteiro, por me acompanhar desde a graduação e incentivar-me o tempo inteiro, é minha inspiração como pessoa e profissional, palavras não são suficientes para expressar a gratidão que tenho em tê-la na minha vida, os ensinamentos passados vão além do profissional. Muito Obrigada!

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a Andréa Teixeira, pela disposição e ensinamentos passados.

À Karina Fook, Alessandra Sales e Carla Déa, funcionárias e amigas do Laboratório de Análises Clínicas do HUUFMA, que me auxiliaram na pesquisa e sempre estiveram dispostas a ajudar.

À Malene, Lucas Carreiro e Mateus, pelo apoio e ajuda durante o desenvolvimento da pesquisa, vocês foram maravilhosos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pelo apoio e incentivo financeiro para realização desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto (PPGSAD) e aos docentes por contribuírem para a minha formação.

Ao Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão e toda a equipe do Laboratório de Análises Clínicas do HUUFMA pelo espaço cedido para o estudo.

Ao Instituto René Rachou (FIOCRUZ-MG) e a todos que ajudaram nas análises dos dados.

Aos meus pais e ao meu irmão, por todo apoio ao longo desta caminhada. Amo vocês.

*“Se você não sabe para onde ir, qualquer
caminho serve”*

(Lewis Carroll)

RESUMO

Introdução: A COVID-19 é uma doença causada pelo vírus SARS-CoV-2, altamente infeccioso, levando a milhares de contaminados em poucos dias. Um achado importante nos pacientes acometidos com a COVID-19 é a alteração em parâmetros hematológicos e elevação da concentração sérica de citocinas inflamatórias, como a interleucina 6 (IL6), sobretudo em casos graves da doença. Este estudo objetivou caracterizar parâmetros hematológicos e inflamatórios em pessoas acometidas por COVID-19 e analisar o poder de predição desses biomarcadores para a gravidade da doença. **Métodos:** Trata-se de um estudo translacional com pacientes adultos, positivos para SARS-CoV-2 e residentes em uma região da Amazônia Legal (São Luís/MA) dos quais coletou-se dados sociodemográficos (idade, sexo, raça/cor, estado civil, local de origem), hospitalares (resultado do teste de molecular para COVID-19, local de internação – enfermaria ou unidade de tratamento intensivo, saturação de oxigênio, desfecho – alta hospitalar ou óbito) e laboratoriais (hemograma completo, proteína C Reativa - PCR, ferritina sérica). Além disso, realizou-se o cálculo de parâmetros inflamatórios (Relação Neutrófilo-Linfócito – RNL e Relação Neutrófilo-Plaquetas - RNP) e determinou-se a concentração sérica de citocinas pró-inflamatórias [Interleucina 6 (IL-6), Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-alfa), Interferon Alfa-2 (IFN-alfa2), Interleucina 12p40 (IL-12p40), Interferon Gama (IFN-Gama), Fator de Necrose Tumoral Beta (TNF-Beta), Interleucina 18 (IL-18), Interleucina IL-2R alfa (IL-2R alfa) e Interleucina IL-16 (IL-16)]. Os participantes foram divididos em grupo controle e de acordo com a gravidade da doença (COVID-19 moderada e COVID-19 grave), o que foi determinado pelo local de internação (enfermaria ou UTI) associado a saturação de oxigênio ou necessidade de ventilação mecânica. Os dados foram analisados utilizando-se o software programa estatístico GraphPad Prism® versão 8 e IBM SPSS versão 24, com nível de significância de 0,05. **Resultados:** O número de leucócitos totais (7598.51 ± 3530 versus 13085 ± 7985), neutrófilos (5349.18 ± 3565 versus 21910.75 ± 6808), a RNL (6.13 ± 6.94 versus 15.86 ± 25.53) e a concentração sérica de PCR (4.47 ± 4.77 versus 8.67 ± 7.72) tiveram maiores médias no grupo com a COVID-19 grave, com significância estatística ($p < 0,05$). Os valores de leucócitos totais e neutrófilos apresentaram área sob a curva ROC de 0.747 ($p < 0,05$) e 0.777 ($p < 0,05$), respectivamente. A RNL e PCR apresentaram respectivamente valores de áreas de 0.722 e 0.700. O poder de predição das citocinas pró-inflamatórias em diferenciar os casos moderados dos graves na COVID-19, também foi apresentado em modelos de curva ROC, sendo que a IL-6 apresentou área sob a curva (AUC) de 0,727, com ponto de corte $> 0,93$, a IL-16 apresentou AUC de 0,740, com ponto de corte $> 33,55$ e o IFN-Alfa2 mostrou uma AUC de 0,727, com ponto de corte $> 3,06$ demonstrando serem bons preditores de gravidade da COVID. **Conclusão:** Este estudo demonstrou que parâmetros laboratoriais como o número de leucócitos totais, de neutrófilos, a RNL, a PCR, bem como as citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-16 e IFN-Alfa2 foram capazes de predizer a gravidade da COVID-19 podendo assim, serem biomarcadores laboratoriais de grande auxílio no manejo clínico do paciente.

Palavras-Chaves: COVID-19. Citocinas. Severidade. Prognóstico.

ABSTRACT

Introduction: COVID-19 is a disease caused by the highly infectious SARS-CoV-2 virus, leading to thousands of infected in a few days. An important finding in patients affected with COVID-19 is the change in hematological parameters and increased serum concentration of inflammatory cytokines, such as interleukin 6 (IL6), especially in severe cases of the disease. This study aimed to characterize hematological and inflammatory parameters in people affected by COVID-19 and to analyze the predicting power of biomarkers for the severity of the disease. **Methods:** This is a translational study with adult patients, positive for SARS-CoV-2 and living in a region of the Legal Amazon (São Luís/MA) from which sociodemographic data (age, gender, race/color, marital status, place of origin), health (molecular test result for COVID-19, place of hospitalization – infirmary or intensive treatment unit, oxygen saturation, discharge - hospital discharge or death) and laboratory discharge (hcomplete emogram, C Reactive protein - PCR, ferritin. In addition, inflammatory parameters (Neutrophil-Lymphocyte-Lymphocyte Relationship - RNL and Neutrophil-Platelet Relationship - RNP) were performed and the serum concentration of Pro-Inflammatory Cytokines was determined [Interleukin 6 (IL-6), Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-alpha), Interferon Alpha-2 (IFN-alpha 2), Interleukin 12p40 (IL-12p40), Interferon Gamma (IFN-Gamma), Beta Tumor Necrosis Factor (TNF-Beta), Interleukin 18 (IL-18), Interleukin IL-2R alpha (IL-2R alpha) and Interleukin IL-16 (IL-16)]. The participants were divided into a control group and according to the severity of the disease (moderate COVID-19 and severe COVID-19), which was determined by the place of hospitalization (infirmary or ICU) associated with oxygen saturation or need for mechanical ventilation. The data were analyzed using the software statistical program GraphPad Prism version® 8 and IBM SPSS version 24, with significance level of 0.05. **Results:** The number of total leukocytes (7598.51 ± 3530 versus 13085 ± 7985), neutrophils (5349.18 ± 3565 versus 21910.75 ± 6808), RNL (6.13 ± 6.94 versus 15.86 ± 25.53) and serum CRP concentration (4.47 ± 4.77 versus 8.67 ± 7.72) had higher averages in the group with severe COVID-19, with statistical significance ($p < 0.05$). The values of total leukocytes and neutrophils presented an area under the ROC curve of 0.747 ($p < 0.05$) and 0.777 ($p < 0.05$), respectively. The RNL and PCR showed, respectively, values of areas of 0.722 and 0.700. The predicting power of pro-inflammatory cytokines to differentiate moderate from severe cases in COVID-19, it was also presented in ROC curve models, and IL-6 presented an area under the curve (AUC) of 0.727, with a cutoff point > 0.93 , IL-16 presented AUC of 0.740, with a cutoff point > 33.55 and IFN-Alpha2 showed an AUC of 0.727, with cutoff point > 3.06 demonstrating to be good predictors of covid severity. **Conclusion:** This study demonstrated that laboratory parameters such as the number of total leukocytes, neutrophils, RNL, PCR, as well as pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-16 and IFN-Alfa2 can predict the severity of COVID-19 and may thus be laboratory biomaracators of great help in the clinical management of the patient.

Keywords: COVID-19. Cytokines. Severity. Prognosis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – (Artigo 01) - Descrição de dados sociodemográficos de pacientes positivos para SARS-COV-2 internados no Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão, conforme a severidade da doença. São Luís/MA – 2020.....	33
Tabela 02 -(Artigo 01) - Análise de variáveis preditoras para o desfecho de COVID-19 severa através da regressão logística binária. São Luís/MA – 2020.....	35
Tabela 03-(Artigo 01) - Caracterização dos parâmetros hematológicos e biomarcadores inflamatórios de pacientes positivos para SARS-COV-2 internados no Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão, conforme a severidade da doença. São Luís/MA – 2020.....	36
Tabela 01-(Artigo 02) - Dados sociodemográficos de pacientes com COVID-19, em fase aguda da infecção, internados no Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão. São Luís/MA - Brasil, 2020.....	56
Tabela 02-(Artigo 02) - Perfil de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com COVID-19, em fase aguda da infecção, internados no Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão. São Luís/MA - Brasil, 2020.....	57

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura do Coronavírus	16
Figura 2 - Fluxograma do funcionamento do sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.....	18
Figura 3. Manifestações associadas com a COVID-19.....	21
Figura 4. Ilustração do processo inflamatório na infecção pelo SARS-CoV-2.....	24
Figura 1 (Artigo 01). A. Análise da Curva ROC do poder de discriminação dos parâmetros hematológicos Leucócitos e Neutrófilos quanto a COVID-19 em estágio severo/grave. B. Análise da Curva ROC do poder discriminatórios dos marcadores inflamatórios Relação Neutrófilo-Linfócito e Proteína C Reativa quanto a COVID-19 em estágio severo/grave. C. Sensibilidade e Especificidade de parâmetros hematológicos e Marcadores Laboratoriais na Predição da COVID-19 Severa.....	38
Figura 1 (Artigo 02). Comparação entre as concentrações de citocinas pró-inflamatórias entre os grupos Controle, Moderado e Grave.....	58
Figura 2 (Artigo 02). Modelo de Curva ROC de predição de casos de COVID-19 grave. (A) Para a Interleucina IL-6 (B) Para a interleucina IL-16 (C) Para o Interferon IFN-Alfa2 (IFN-Alfa2).....	59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACE: Enzima Conversora de Angiotensina
ACE2: Enzima Conversora de Angiotensina 2
Ang-2: Angiotensina II
CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CLI: Clínica
E: Envelope
EPIN: Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional
IFNs: Interferons
IFN gama: Interferon gama
IL-1: Interleucina 1
IL-10: Interleucina 10
IL-18: Interleucina 18
IL-2: Interleucina 2
IL-4: Interleucina 4
IL-6: Interleucina 6
IL-7: Interleucina 7
IL-9: Interleucina 9
HLH: Linfocitose Hemofagocítica
M: Membrana
MCP-1: Proteína Quimioatraente de Monócitos-1
N: Nucleocapsídeo
PCR: Cadeia da Polimerase
PCR: Proteína C Reativa
PRP: Reconhecimento Padrão
RAS: Sistema Renina-Angiotensina
RNA: Ácido Ribonucleico
RNL: Relação Neutrófilo-Linfócito
RPL: Relação Plaqueta-Linfócito
S: Spike
SRAA: Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
SRAG: Síndrome Respiratória Aguda Grave
TNF-beta: Fator de Necrose Tumoral Beta

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral- α

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

1. INTRODUÇÃO

A COVID-19 é uma doença causada pelo vírus SARS-CoV-2, altamente infeccioso, levando a milhares de contaminados em poucos dias. A doença é caracterizada por uma síndrome respiratória aguda e espalhou-se de forma contínua pelo mundo. Através de técnicas de sequenciamento, o SARS-CoV-2 foi identificado como um betacoronavírus, sendo mais infeccioso que o SARS-CoV, tendo um alto poder de virulência.

A transmissão da COVID-19 ocorre através de gotículas respiratórias, contato direto com os indivíduos infectados ou contato com os fômites contaminados (LI *et al.*, 2020). Os principais sintomas são: febre, tosse seca, fadiga, e desconforto respiratório, além de perda do olfato e paladar. Fatores de risco como: idade avançada, pertencer ao sexo masculino e possuir comorbidades como diabetes, hipertensão arterial, dentre outras podem influenciar na evolução mais rápida para uma pneumonia severa (LAI *et al.*, 2020; SUNDARAM *et al.*, 2021).

No Brasil, os primeiros casos da COVID-19 foram confirmados em fevereiro de 2020, em 3 de fevereiro de 2020 foi declarado Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN) e em maio de 2020 o Brasil contava com 233.142 número de casos (1.109,4 por 1 milhão de habitante) (DA SILVA *et al.*, 2020).

O estudo de Cavalcante *et al.*, (2020), sobre a evolução da epidemia da COVID-19 no Brasil até a semana epidemiológica 20 de 2020, relatou que ao comparar as Unidades Federativas com maior número de casos acumulados após o 50º. caso, foi possível verificar que o Maranhão (dia 46) juntamente com o Pará (dia 44) estavam em uma fase anterior da epidemia quando comparados com São Paulo (dia 53) e Rio de Janeiro (dia 43). No mesmo estudo de Cavalcante *et al.*, (2020) foi demonstrado que até a semana epidemiológica 20ª. de 2020 o Maranhão apresentava 11.592 casos com 524 óbitos, tendo uma taxa de incidência de 1.367,9 e um taxa de mortalidade de 79,2.

Da Silva *et al.*, (2020) avaliaram o cenário epidemiológico de COVID-19 do nordeste do Brasil do período de 06 de março a 08 de julho de 2020, demonstrando que os estados do Ceará, Bahia e Maranhão ocuparam lugar de destaque por apresentarem maior quantidade de casos confirmados para a COVID-19. Ainda nesse estudo, foi avaliada a distribuição de óbitos por gênero, sendo verificado que todos os estados nordestinos apresentavam maior percentual de óbitos no sexo masculino, e o Maranhão foi o estado que apresentou maior índice (62%) com 1.461 óbitos no sexo masculino.

O mecanismo pelo qual o vírus age no organismo ainda não está bem elucidado na literatura, mas o SARS-CoV-2 demonstrou maior afinidade pelo receptor de enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) para entrada na célula do hospedeiro, que faz parte do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), o qual é responsável por manter o equilíbrio hidroeletrolítico e a homeostase dos níveis pressóricos (LI *et al.*, 2020; VABRET *et al.*, 2020). Outro achado importante nos pacientes acometidos com a COVID-19 é a elevação da concentração sérica de citocinas inflamatórias, como a interleucina 6 (IL6), sobretudo em casos graves da doença (LEISMAN *et al.*, 2020).

A tempestade de citocinas, assim chamado o aumento exacerbado da liberação de citocinas, foi elencada como uma das principais causas para a alta mortalidade nos pacientes com o SARS-CoV-2. Em pacientes com a COVID-19 grave foram encontrados níveis elevados de IL-6 e interleucina 2 (IL-2), como também o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (PONS *et al.*, 2020). Ademais, a tempestade de citocinas tem sido correlacionada diretamente com a lesão pulmonar, segundo Gustine e Jones (2021) na análise pós-morte de pacientes com COVID-19 foi identificada uma inflamação com infiltração de linfócitos e macrófagos no tecido pulmonar sugerindo a hiperinflamação no órgão; ainda, foram observados danos alveolares com a presença de microtrombos de fibrina. Além disso, o aumento das citocinas no organismo caracterizou uma inflamação sistêmica, com elevação de marcadores inflamatórios, como ferritina sérica, com instabilidade hemodinâmica e falência múltipla dos órgãos (LEE *et al.*, 2020).

As citocinas são proteínas pequenas que ao serem secretadas pelas células desenvolvem atividades específicas. Dessa maneira, os macrófagos liberaram citocinas pró-inflamatórias que induzem maior resposta inflamatória, tendo como exemplos a interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 16 (IL-16), interleucina 18 (IL-18) e Fator de Necrose Tumoral beta (TNF- β), por outro lado as citocinas reguladoras ou anti-inflamatórias reduzem o processo inflamatório como a interleucina 4 (IL-4), interleucina 9 (IL-9), interleucina 10 (IL-10), dentre outras (CRUVINEL *et al.*, 2010). Por sua vez, as quimiocinas são tipos de citocinas que são responsáveis pela transição dos leucócitos para os locais de inflamação, como as CXCL10, CCL4 e CCL3. Os fatores de crescimento são citocinas ou proteínas que podem promover ou inibir o crescimento celular, como por exemplo interleucina 2 (IL-2), interleucina 7 (IL-7), dentre outros (CRUVINEL *et al.*, 2010).

De acordo com Ali *et al.* (2021) interleucinas, MCP-1 (Proteína Químioatraente de Monócitos-1) e fatores de crescimento foram encontrados em altas concentrações em

pacientes com a COVID-19 grave. Huang et al. (2020) mostraram que pacientes em estado grave possuíam elevados níveis de citocinas tais como interleucina 1 beta (IL-1 β), interferon gama (IFN-gama) e MCP-1. De forma semelhante, Ruan et al. (2020) verificaram que pacientes com COVID-19 em estado crítico e internados na unidade de terapia intensiva (UTI) apresentaram maiores níveis circulantes de IL-2, IL-7, IL-10 e TNF- α .

Diante disso, há a necessidade de entender o mecanismo inflamatório exacerbado na COVID-19, sobretudo no que concerne à presença de moléculas biologicamente ativas como as citocinas que pode resultar em consequências clínicas desfavoráveis, como o desfecho óbito. Dessa maneira, o objetivo do presente estudo é avaliar a presença de citocinas na COVID-19 bem como o seu poder de predição no prognóstico da doença.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Novo Coronavírus:

Por volta de dezembro de 2019, surgiram pessoas com um tipo de pneumonia de causa desconhecida na província de Wuham, na China. O surgimento da pneumonia associou-se de maneira epidemiológica a pacientes que frequentavam o mercado de animais vivos da província Hubei. Dessa forma, ainda em dezembro de 2019 o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) iniciou o estudo investigativo para identificar o patógeno e o paciente zero da infecção, bem como o ciclo de transmissão (SIFUENTES-RODRÍGUEZ e PALACIOS-REYES, 2020).

Após análise de material bronco-alveolar de pacientes doentes, leituras virais demonstraram a compatibilidade para a linhagem do gênero beta-coronavírus (vírus COV). Os vírus COV são assim denominados devido a projeções, presentes em sua superfície, formando uma coroa, sendo denominados por coroa (do latim).

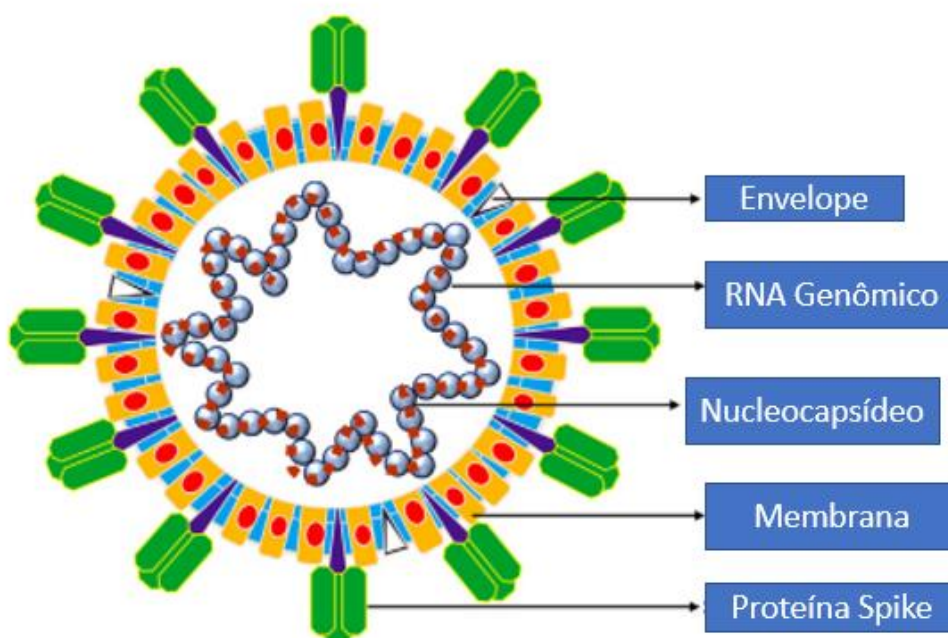
Os vírus COV possuem material genético formado por ácido ribonucleico (RNA) envelopados, com alto poder infeccioso e de fita simples, pertencentes à família *Coronaviridae*, tendo a capacidade de infectar humanos e animais causando doenças do sistema respiratório, hepático, entérico e neurológico. Mesmo diante da diversidade existente na família *Coronaviridae*, somente dois CoVs foram identificados nas últimas décadas, o SARS-CoV responsável pela Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) infectando mais de 8.000 mil pessoas na China e o (MERS-CoV) responsável Síndrome Respiratória Oriental, o qual atingiu 857 pessoas (casos confirmados oficialmente). Ainda, foi relatado que o vírus MERS-CoV possui maior severidade quando comparado ao vírus SARS-CoV, ou seja, tendo um maior risco de óbito em pacientes doentes (HE *et al.*, 2020).

O SARS-CoV-2 identificado e sequenciado compartilha 79,5% da sua sequência genética com o SARS-CoV e 50% com o MERS-CoV. A hipótese aceita através do sequenciamento genômico, é que a origem desse vírus está atrelada ao vírus CoV do morcego, o qual conseguiu infectar o ser humano. Por outro lado, segundo He et al. (2020) e Hosseini et al. (2020) ainda não há evidências suficientes para indicar qual animal pode ser o hospedeiro intermediário do SARS-CoV-2.

No que concerne à estrutura do SARS-CoV-2, o genoma é constituído por duas regiões não traduzidas, um quadro de leitura aberto longo (ORF1ab), uma poliproteína não estrutural, quatro proteínas estruturais: proteína Spike (S), Envelope (E), Membrana (M) e

Nucleocapsídeo (N) e cinco proteínas acessórias. A proteína S é fundamental para a entrada do vírus no organismo humano, isto é, através dessa proteína o vírus liga-se às células (pulmonares) do hospedeiro humano. Essa proteína é subdividida em domínios S1 e S2, sendo que o domínio S1 é responsável pela ligação ao receptor, e o domínio S2 tem a função de fundir-se com a membrana celular (HE *et al.*, 2020), sendo assim, responsável pela patogênese do vírus, ou seja, pela liberação do vírus no citoplasma do hospedeiro (HOSSEINI *et al.*, 2020). A Figura 1 demonstra a estrutura do SARS-CoV-2.

Figura 1. Estrutura do Coronavírus.



Fonte: Adaptado de Kirtipal et al. (2020)

A proteína S liga-se ao receptor da enzima de conversão de angiotensina do tipo 2 (ACE-2), sendo um componente do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA), responsável por manter a pressão sanguínea, líquidos e eletrólitos em homeostase, bem como controlar a vasoconstrição renal. O receptor ACE-2 compõe o sistema de feedback fisiológico nos rins, as células justaglomerulares convertem a pró-renina inativa em renina ativa que é secretada diretamente na circulação sanguínea. Logo, a renina plasmática converte o angiotensinogênio hepático em angiotensina I (Ang-1), a enzima de conversão de angiotensina (ACE) converte Ang-1 em sua forma ativa, ou seja, a Angiotensina II (Ang-2), um potente vasoconstritor. Além disso, a ACE-2 catalisa a clivagem da Angiotensina II em

Ang 1-7 e Angiotensina I em Ang 1-9. A ACE-2 participa de diversos processos fisiológicos e patológicos como a inflamação, a vasoconstrição e o estresse oxidativo (SHUKLA e BANERJEE, 2021).

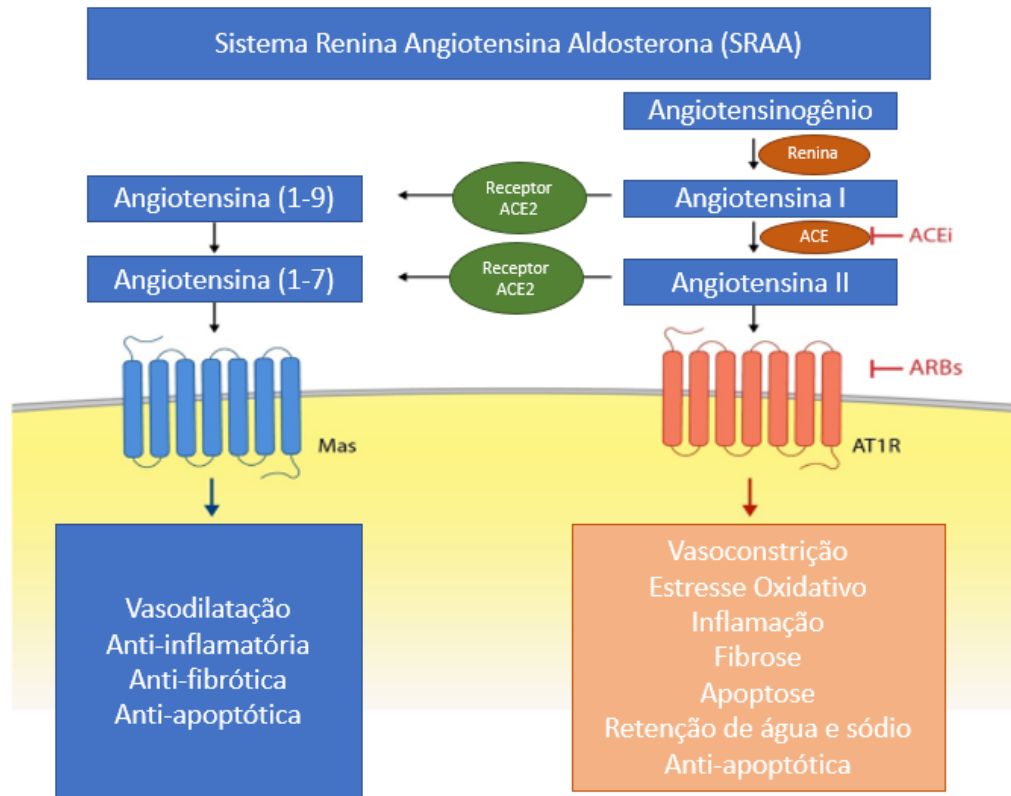
Ainda, em relação a associação entre o tropismo do SARS-CoV-2 pelo receptor ACE-2, o mecanismo demonstra que a proteína Spike (S) compete com a Ang-2, podendo bloquear a atividade da ACE, diminuindo sua disponibilidade e consequentemente desencadeando um desequilíbrio no organismo, aumentando assim o eixo ACE/Ang-2/AT1R, desenvolvendo os efeitos de vasoconstrição, inflamação, estresse oxidativo, dentre outros. Além disso, o sistema cinina-caliceína pode ser afetado durante a infecção pelo coronavírus, tendo em vista que as quininas são clivadas pela ACE, assim mudanças nos níveis de ACE, como a sua diminuição, é considerado um efeito protetor em doenças associadas com o estresse oxidativo como a diabetes mellitus (KAYASHIMA *et al.*, 2012). Na infecção pelo SARS-CoV-2 há o aumento do eixo ACE/AngII/AT1R ocorrendo desequilíbrio na quantidade de ACE e consequentemente o aumento do estresse oxidativo (BEYERSTEDT *et al.*, 2021).

O eixo principal do sistema renina angiotensina-aldosterona é a composição do ACE/AngII e receptores AT1 e AT2 de angiotensina II. Assim sendo, a Angiotensina II pode desempenhar funções de acordo com o tipo de receptor, por exemplo, quando se liga ao receptor AT1 produz os efeitos clássicos da Angiotensina II, como o aumento do estresse oxidativo, inflamação, vasoconstrição e fibrose. Se a ligação ocorrer no receptor AT2 há efeitos como vasodilatação, anti-inflamação e anti-fibrose. O Ang 1-7 é o principal produto da ligação entre ACE e Ang-II, e justamente ao ligar-se com o receptor AT2 promove os efeitos contrários ao AT1 citados anteriormente, minimizando os efeitos da Ang-II (BEYERSTEDT *et al.*, 2021).

O receptor ACE-2 possui expressão nas células epiteliais dos alvéolos pulmonares, tropismo do SARS-CoV-2, a ligação entre a proteína S e o receptor ACE-2 na célula permite a endocitose do vírus nos alvéolos causando danos no tecido pulmonar. Posterior a entrada do vírus pelo receptor ACE-2, ocorre a clivagem entre as subunidades S1 e S2 da proteína S, sendo regulada pelo receptor transmembranar protease serina 2 (TMPRSS2). A subunidade S2 completa a fusão da membrana viral com a célula, iniciando o processo de liberação do conteúdo viral, replicação e infecção de outras células (SHUKLA e BANERJEE, 2021; AL-ZAIDAN *et al.*, 2021).

A Figura 2 demonstra um fluxograma do funcionamento do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona e eixo ACE/Ang-II/AT1R.

Figura 2. Fluxograma do funcionamento do sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona. ACE: Enzima Conversora de Angiotensina; ACE2: Enzima Conversora de Angiotensina 2



Fonte: Adaptado de Beyerstedt et al. (2021).

Outro fator importante para a patogênese da COVID-19 é que a desregulação no sistema cinina-caliceína pela regulação negativa da ACE, a qual aumenta os níveis de bradicinina, induzindo a vasoconstrição, devido a presença dos seus receptores B1 que geralmente são expressos somente em processos patológicos. Dessa maneira, os receptores B1 da bradicinina podem estar relacionados com a tempestade de citocinas presentes em casos graves da COVID-19 (BEYERSTEDT *et al.*, 2021; COOPER *et al.*, 2021).

No organismo humano, há a expressão do receptor ACE-2 em outros órgãos além do pulmão, como no sistema digestório, células epiteliais da mucosa oral e enterócitos do intestino delgado, além de também ser expresso no tecido hepático e renal, nas células epiteliais da vesícula biliar, células endoteliais vasculares e sistema reprodutivo masculino e feminino, o que pode explicar a diversidade de sintomas da doença bem como o processo inflamatório exacerbado.

2.2 COVID-19

A Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu como COVID-19 a doença causada pelo vírus SARS-CoV-2. O período de incubação do vírus varia de 3 a 7 dias, podendo se perpetuar por até 14 dias, a doença possui como sintomas principais: febre, tosse e fadiga, além de sintomas respiratórios em casos mais graves, como a falta de ar. Além disso, são características do quadro clínico da doença o padrão em vidro fosco periférico e bilateral no pulmão identificado através da Tomografia Computadorizada (TC) (ASSELAH *et al.*, 2021).

A transmissão da doença ocorre por meio de gotículas, superfícies ou mãos contaminadas e por inalação de gotículas de ar em determinada distância (sendo necessária a utilização de máscaras de proteção), ocorrendo de humano para humano, o que torna a doença altamente transmissível. O vírus pode permanecer infeccioso em superfícies contaminadas por cerca de até 9 dias, logo, o contato direto das mãos contaminadas com as mucosas é a principal via de transmissão do SARS-CoV-2, sendo adotadas medidas de prevenção como a lavagem das mãos e o uso de álcool em gel, essenciais para a quebra da cadeia de transmissão (SHARMA *et al.*, 2021).

O agravamento da COVID-19 tem sido associado com fatores de riscos pré-existent no indivíduo, como a presença de comorbidades como diabetes mellitus, hipertensão arterial, obesidade, doença renal crônica, bem como idade avançada. No estudo de Zhou *et al.* (2020) com 191 pacientes chineses, 54 foram a óbito e 50% desses apresentavam alguma comorbidade. Há uma alta expressão receptor ACE-2 no tecido adiposo, sendo até mais alta do que os outros tecidos, o que segundo Al-Zaidan *et al.* (2021) justifica a presença de obesidade ser um fator de risco para a progressão negativa da doença, além disso, segundo Pathangey *et al.* (2020) o tropismo direto do SARS-CoV-2 sobre os receptores ACE-2, distribuído em vários tecidos, leva a lesão em múltiplos órgãos, ainda, indivíduos hipertensos que possuem polimorfismos no gene da ACE podem predispor a infecção mais severa do coronavírus e consequentemente maiores complicações cardiovasculares.

Adicionalmente o processo inflamatório associado a doença leva alterações em órgãos nobres, como o coração, rins o tecido hepático, além de efeitos no sistema gastrointestinal. No que concerne ao tecido cardíaco, Pathangey *et al.* (2020) afirmam que a expressão abundante da ACE-2 nesse tecido indica uma invasão direta do vírus, visto que facilitam a entrada de SARS-CoV-2 e sua alta taxa de replicação, causando desregulação no eixo Ang-1-7 e consequentemente inflamação, liberação de espécies reativas de oxigênio, vasoconstrição e dano cardíaco.

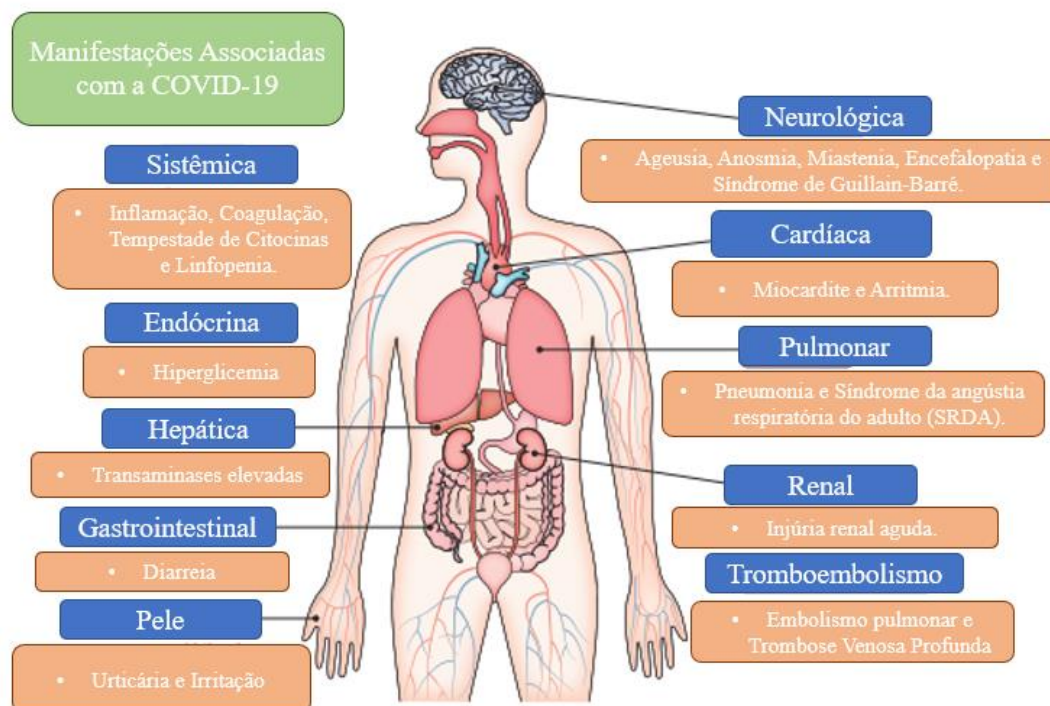
O pulmão é o principal órgão afetado pelo SARS-CoV-2 devido ao tropismo do vírus pelas células pulmonares. O vírus liga-se ao receptor ACE-2 do alvéolo pulmonar através da proteína estrutural Spike (S), sendo o pulmão o sítio de entrada do vírus no organismo. Os pacientes com COVID-19 apresentam edema pulmonar, lesão alveolar difusa, presença de hiperplasia do tipo II e inflamação de células mononucleares (HU *et al.*, 2021).

No sistema renal, novamente, a alta expressão de ACE-2 e a presença da doença renal crônica corrobora para o estado da COVID-19 mais grave bem como a possível falência do órgão (PATHANGEY *et al.*, 2020). Uma metanálise de Ssentongo *et al.* (2020) com 25 estudos evidenciou que pacientes com doença renal crônica possuem mais riscos de mortalidade por COVID-19, demonstrando a maior lesão dos rins pelo SARS-CoV-2.

A lesão hepática pode ocorrer devido a exacerbada liberação de citocinas, sendo observada degeneração nos hepatócitos, na bile capilar e necrose focal ocasionando alterações nas enzimas hepáticas sanguíneas. Doenças pré-existentes como hepatites e uso de medicamentos de uso contínuo e do próprio tratamento da COVID-19 podem intensificar este processo de lesão (XU *et al.*, 2020). Além disso, Harisha *et al.* (2022) demonstraram que o SARS-CoV-2 pode ligar-se à ACE-2 em colangiócitos, levando a sua disfunção e por consequência uma resposta inflamatória sistêmica desencadeando uma lesão hepática.

No sistema gastrointestinal surgem manifestações como vômito, diarreia e falta de apetite, isso se deve a alta expressão de ACE-2 no sistema gastrointestinal, especificamente nos enterócitos (PATHANGEY *et al.*, 2020).

A alta expressão de ACE-2 nos órgãos leva ao aumento da carga viral, bem como toxicidade ao órgão, hiperinflamação e disfunção endotelial, sobretudo devido a desregulação do eixo ACE-2/Ang-II (PATHANGEY *et al.*, 2020). No mais, podem ocorrer manifestações neurológicas como anosmia, aguesia, encefalopatia, dentre outras. A imagem de Asselah *et al.* (2021), demonstra a síntese dessas alterações no organismo (Figura 3).

Figura 3. Manifestações associadas com a COVID-19

Fonte: Adaptado de Asselah et al. (2021).

2.3 Diagnóstico da COVID-19

O diagnóstico da COVID-19 pode ser realizado através de testes com o ácido nucleico e sorológicos, bem como pela tomografia computadorizada, cada um sendo utilizado conforme a necessidade, ou seja, a depender do tempo de incubação do vírus ou de sintomas do paciente.

A detecção do ácido ribonucleico (RNA) viral ocorre através do método da reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo utilizado para diagnóstico a técnica de RT-qPCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real), considerada padrão ouro no diagnóstico do SARS-CoV-2. A RT-qPCR utiliza material biológico da nasofaringe para detecção do vírus (ASSELAH *et al.*, 2021). O ensaio RT-qPCR foi desenvolvido com a finalidade de identificar diferentes genes como o gene nucleocapsídeo, gene do envelope viral, gene spike e regiões ORF1b ou ORF8 do genoma do SARS-CoV-2. Por outro lado, o RT-qPCR possui desvantagens como alto custo, necessidade de pessoal qualificado bem como levar de 4 a 6 horas para serem concluídos (RAI *et al.*, 2021).

Os testes sorológicos são mais acessíveis quando comparados ao RT-qPCR. Esses testes podem identificar anticorpos (IgM e IgG) ou antígenos. Além disso, embora o RT-

qPCR seja o padrão ouro no diagnóstico, após 14 dias da infecção pelo coronavírus, o RNA viral é quase indetectável. A detecção de anticorpos para SARS-CoV-2 pode ocorrer utilizando amostras biológicas de punção digital ou soro, contudo devido a resposta imunológica tardia da produção de anticorpos, esses testes são mais utilizados para fins epidemiológicos. A técnica baseia-se no ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), a IgM pode ser detectada após 3 a 6 dias após do início da infecção, já a IgG é detectada no final da fase da infecção (14 dias após início dos sintomas) (LONG *et al.*, 2020; ASSELAH *et al.*, 2021; RAI *et al.*, 2021).

Não obstante, os testes de detecção de antígenos entraram no mercado como alternativa para detecção do novo coronavírus, sendo coletadas também amostras nasofaríngeas (LONG *et al.*, 2020; ASSELAH *et al.*, 2021). A detecção de antígenos é um método mais barato, rápido e ao contrário da sorologia pode ser utilizado para diagnóstico ainda no início da infecção (FILCHAKOVA *et al.*, 2022).

Outra forma de diagnóstico da infecção pelo SARS-CoV-2 é o exame por tomografia computadorizada (TC) de tórax, sendo uma das suas finalidades a detecção de doença pulmonares. Os achados pulmonares encontrados na TC é a imagem em vidro fosco, considerado o padrão da conduta, porém, pode haver resultados falso-positivos, além de que possui somente 69% de sensibilidade quando comparada a 91% da RT-qPCR. Outro fato que pode invalidar a TC no diagnóstico da infecção por coronavírus é que 20% dos pacientes infectados não apresentam qualquer anormalidade pulmonar na TC (RAI *et al.*, 2021).

2.4 Respostas Inflamatórias e Tempestade de Citocinas

A real interação entre o SARS-CoV-2 e o sistema imunológico ainda não foi totalmente esclarecida, mas sabe-se que as imunidades inata e adaptativa desempenham um papel importante na resposta contra o vírus. A infecção do SARS-CoV-2 inicia-se com a proteína S ligando-se ao receptor ACE-2, por conseguinte, o RNA do coronavírus é identificado por um receptor de reconhecimento padrão (PRR), que ativa as células NF- κ B (PACES *et al.*, 2020; TAN *et al.*, 2021; HU *et al.*, 2021).

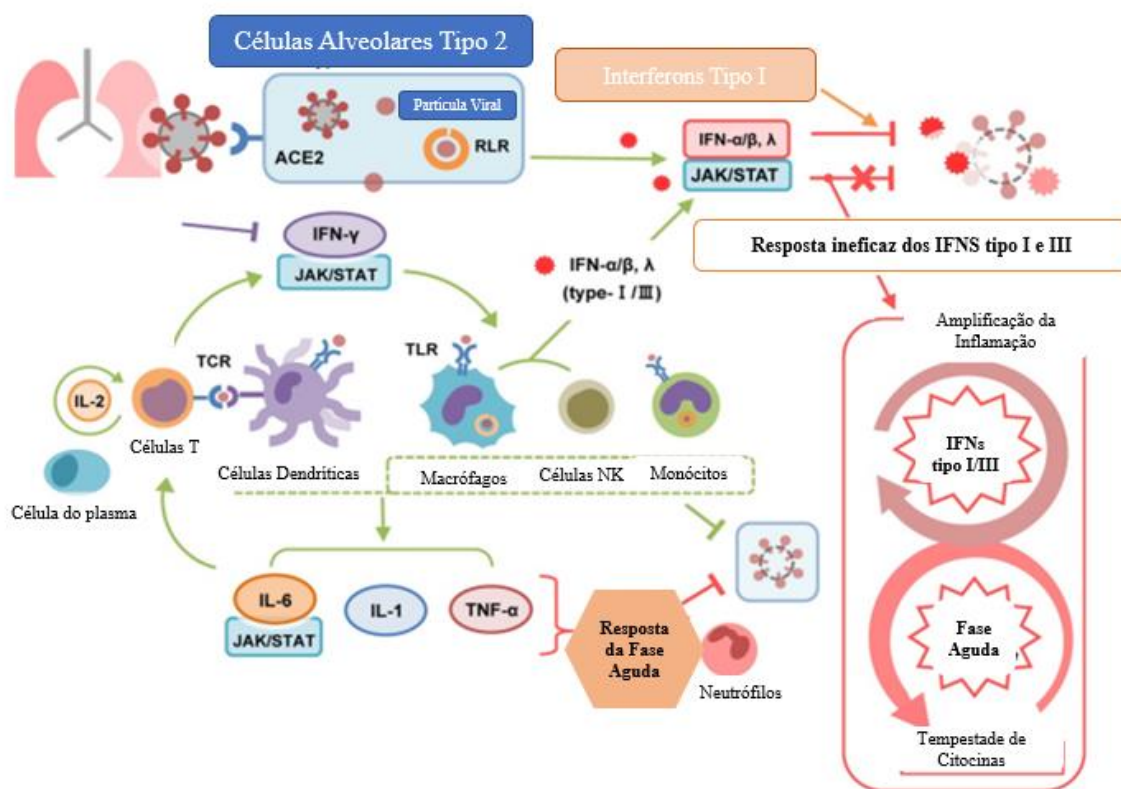
O vírus ocupa o receptor ACE-2 e ocorre aumento de Ang-II, logo, o eixo ACE/Ang-II/AT1R induz a produção de TNF- α e a forma solúvel da IL-6 (sIL-6Ra) via desintegrina e metaloprotease, ainda, a IL-6 se liga a sIL-6R através de GP130 para formar o complexo IL-6-sIL-6Ra que pode ativar STAT3 em células não imunes. Assim, o NF- κ B e STAT3 podem ativar o amplificador IL-6 (IL-6 Amp) para indução da produção de citocinas pró-

inflamatórias como o fator de crescimento endotelial (VEGF), proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1), IL-8 e IL-6, resultando em um processo inflamatório que poderá evoluir para uma tempestade de citocinas (PACES *et al.*, 2020; TAN *et al.*, 2021; HU *et al.*, 2021).

O SARS-CoV-2 pode ativar células como os linfócitos T do tipo helper 1 (LTh1) que secretam citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e estimuladoras de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), esta última ativa ainda mais células como os linfócitos CD4+, os CD16+ e monócitos, para produzir maiores quantidades de IL-6, TNF- α e demais citocinas, intensificando a resposta inflamatória e desencadeando a tempestade de citocinas. A resposta imune inicia-se com a produção de células B que produzem anticorpos como os linfócitos LT CD4+ e LT CD8+. Os linfócitos LT CD8+ liberam inúmeras citocinas para contenção de vírus (HU *et al.*, 2021).

A ilustração de Kim *et al.* (2021) demonstra a fisiopatologia da COVID-19 (Figura 4). O processo inicia-se com os interferons (IFNs) do tipo 1 que inibem o estágio inicial da infecção. Posteriormente, as células dendríticas e macrófagos são ativados para reconhecerem o vírus, induzindo assim a resposta de fase aguda por meio da liberação de citocinas pró-inflamatórias como: IL-6, IL-1 e TNF- α . A IL-6 estimula os linfócitos T para ativar a imunidade adaptativa, bem como estimulam os macrófagos e células natural killer (NK), através do IFN-gama, para remoção do vírus. Porém, ocorre a falha na imunidade inicial e a resposta do IFN-gama aumenta excessivamente levando liberação exacerbada de citocinas.

Figura 4. Ilustração do processo inflamatório na infecção pelo SARS-CoV-2



Fonte: Adaptado de Kim et al. (2021).

De acordo com Ye et al. (2020) uma alta expressão de citocinas como IL-1B, IFN-gama, MCP-1 foi detectada em pacientes com COVID-19. Assim também, no estudo de Huang et al. (2020) ao comparar os pacientes que estavam na unidade de terapia intensiva com os pacientes em leito de enfermaria verificou que os pacientes em tratamento intensivo apresentaram níveis plasmáticos mais elevados de IL-2, IL-7, IL-10, GSCF, IP10, MCP1, MIP1A e TNF-α, dessa forma, os autores sugeriram que a tempestade de citocinas está associada com a gravidade da doença.

De maneira semelhante, no estudo de Chen et al. (2020) também foi encontrado níveis mais altos de biomarcadores como enzimas hepáticas (aspartato e amino transferases – AST e ALT), lactato desidrogenase (LDH), proteína C reativa (PCR), ferritina, D-dímero e citocinas (IL-2R, IL-6, IL-10 e TNF-α) nos casos graves de COVID-19 quando comparados aos casos moderados, sugerindo que a liberação exacerbada de citocinas pode estar relacionada a

gravidade e pior desfecho da doença. O estudo de Liu et al. (2020) também verificou o aumento de níveis de IL-6, IL-10, IL-2 e IFN-gama no sangue periférico de pacientes com casos graves em comparação com os casos leves, ainda, que à medida que os pacientes se recuperam gradativamente da doença os níveis de citocinas foram diminuídos equiparando-se aos casos leves.

A tempestade de citocinas pode ser a explicação para as manifestações da COVID-19 extrapulmonar, ou seja, em outros órgãos. Ye et al. (2020) observaram, em pacientes sem sinais de insuficiência respiratória, a presença de alterações nas enzimas hepáticas e na creatinina sérica, sugerindo o efeito da liberação exacerbada de citocinas em outros órgãos, sendo a tempestade de citocinas um fator de prognóstico para a COVID-19.

Segundo McGonagle et al. (2020) a tempestade de citocinas é o resultado de uma falha do sistema imunológico em conter o vírus, sendo dividida em dois estágios: o primeiro corresponde a uma deficiência imunológica temporária, e o segundo é caracterizado pelo sistema imunológico hiperativo para compensar a falha imunológica tendo como manifestação clínica a própria tempestade de citocinas. Neste contexto, leva-se a sugerir que na COVID-19 a liberação exacerbada de citocinas ocorre somente no estágio posterior da doença, ou seja, na cronificação da mesma (MACNAGLE *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2021).

Segundo Kim et al. (2021) pode haver uma predisposição genética à tempestade de citocinas, tornando as pessoas mais vulneráveis para desenvolver o processo inflamatório exacerbado. Na doença Linfocitose Hemofagocítica (HLH) isso já está evidenciado, tendo em vista que a HLH primária ocorre devido a defeitos genéticos na ação das células natural killer e linfócitos T citotóxicos. Assim sendo, a tempestade de citocinas na COVID-19 pode também ser influenciada pelo contexto genético, o que explicaria o prognóstico e evolução diferente nos pacientes infectados.

A tempestade citocina pode ser a chave terapêutica e de entendimento da fisiopatologia da COVID-19 no organismo humano, porém, para elucidação deste processo mais estudos epidemiológicos precisam ser realizados.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Caracterizar parâmetros hematológicos e inflamatórios em pessoas acometidas por COVID-19 e analisar o poder de predição dos biomarcadores para a severidade da doença.

3.2 Objetivos Específicos:

- Descrever o perfil sociodemográfico e de saúde dos participantes;
- Classificar a severidade da doença de acordo com os dados hospitalares;
- Determinar os parâmetros hematológicos, inflamatórios e a concentração sérica de citocinas pró-inflamatórias;
- Avaliar o poder global de predição de severidade da COVID-19 de acordo com os biomarcadores analisados.

4 RESULTADOS

4.1 Capítulo de Livro

Editora de submissão: Atena Editora

Data de Submissão: 23/03/2022

Status: Publicado em maio de 2022.

PREDIÇÃO DA SEVERIDADE DA COVID-19 ATRAVÉS DE MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E HEMATOLÓGICOS

PREDICTION OF COVID-19 SEVERITY THROUGH INFLAMMATION AND HEMATOLOGICAL MARKERS: PRELIMINARY STUDY

Alice de Sá Ferreira

Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto, São Luís, Maranhão.

<http://lattes.cnpq.br/0878481973677360>

Alessandra Costa de Sales Muniz

Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto, São Luís, Maranhão.

<http://lattes.cnpq.br/7484787044651661>

Carla Déa Trindade Barbosa

Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto, São Luís, Maranhão.

<http://lattes.cnpq.br/0378738743394916>

Karina Donato Fook

Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto, São Luís, Maranhão.

<http://lattes.cnpq.br/6982352517858313>

Mônika Machado de Carvalho

Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto, São Luís, Maranhão.

<http://lattes.cnpq.br/8007652054585133>

Déborah Rocha de Araújo Gomes

Universidade Federal do Maranhão, Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão.

ORCID: 0000-0002-9745-1785

Maria Fernanda Lima Bertolaccini

Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto, São Luís, Maranhão.

<http://lattes.cnpq.br/4850261957662771>

Ana Cléa Cutrim Diniz de Moraes

Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto, São Luís, Maranhão.

<http://lattes.cnpq.br/6778219647180808>

Marilde Abreu Diniz

Universidade Federal do Maranhão, Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão.

<http://lattes.cnpq.br/3704984606285729>

Malene Lima Gomes Sodré

Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto, São Luís, Maranhão.

<http://lattes.cnpq.br/9150295263135096>

Andrea Texeira de Carvalho

Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração. Belo Horizonte, Minas Gerais.

<http://lattes.cnpq.br/3798623797837575>

Sally Cristina Moutinho Monteiro

Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto, São Luís, Maranhão.

<http://lattes.cnpq.br/4190147129451754>

RESUMO. Objetivo. Verificar as alterações em índices hematológicos, marcadores inflamatórios e seus poderes de predição no prognóstico da COVID-19. **Metodologia.** Trata-se de um estudo translacional com pacientes adultos, maranhenses, positivos para SARS-CoV-2. Foram coletados dados como: idade, sexo, raça/cor, estado civil, local de origem, renda, hemograma completo, Proteína C Reativa (PCR), ferritina sérica, além dos cálculos das Relação Neutrófilo-Linfócito (RNL) e Relação Neutrófilo-Plaquetas. Analisou-se os dados categóricos pelos testes do qui-quadrado ou exato de Fisher e Regressão Logística Binária. As variáveis numéricas foram submetidas aos testes t de *student* e Mann-Whitney; os parâmetros significativos foram incluídos na construção de curvas ROC (CEP n. 4.157.769). **Resultados.** Coletou-se 136 adultos (18-80 anos), 58.8% de homens, com idade ≤ 60 anos (54.4%), 63.2% solteiro/separado/viúvo, cor parda (44.9%), procedência da capital São Luís (58.1%), com 23.5% de óbito. Verificou-se que pertencer ao sexo masculino e pacientes da capital aumentam em 2.402 e 2.780 vezes a chance da COVID-19 ser severa, respectivamente. O número de leucócitos (7598.51 ± 3530 versus 13085 ± 7985) e neutrófilos (5349.18 ± 3565 versus 21910.75 ± 6808), RNL (6.13 ± 6.94 versus 15.86 ± 25.53) e a PCR (4.47 ± 4.77 versus 8.67 ± 7.72) tiveram maiores médias no grupo com a COVID-19 severa. Os Leucócitos e Neutrófilos apresentaram área sob a curva ROC 0.747 ($p < 0.05$) e 0.777 ($p < 0.05$), respectivamente. A RNL e PCR, apresentaram respectivamente valores de áreas de 0.722 e 0.700. **Conclusão.** Este estudo demonstrou que sexo e origem podem influenciar na gravidade

da COVID-19, bem como parâmetros laboratoriais como leucócitos, neutrófilos, RNL e PCR ao estarem alterados podem prever a severidade da doença.

Palavras-Chaves: Coronavírus. COVID-19. Prognóstico.

ABSTRACT. Objective. To verify changes in hematological indices, inflammatory markers, and their powers of prediction in the prognosis of COVID-19. **Methods.** This is a translational study with adult patients, Maranhão, positive for SARS-CoV-2. Data were collected such as: age, gender, race/color, marital status, place of origin, income, hemogram, C-Reactive Protein (PCR), ferritin, and the calculations of neutrophil-lymphocyte ratio (RNL) and neutrophil-platelet ratio. Categorical data were analyzed by Fisher's chi-square or exact tests and Binary Logistic Regression. The numerical variables were submitted to the student's t test and Mann-Whitney; the significant parameters were included in the construction of ROC curves (CEP n. 4,157,769). **Results.** We collected 136 adults (18-80 years), 58.8% of men, aged ≤ 60 years (54.4%), 63.2% single/separated/widowed, brown color (44.9%), origin of the capital São Luís (58.1%), with 23.5% death. It was thought that belonging to males and patients from the capital increase by 2,402 and 2,780 times the chance of COVID-19 being severe, respectively. The number of leukocytes (7598.51 ± 3530 versus 13085 ± 7985) and neutrophils (5349.18 ± 3565 versus 21910.75 ± 6808 , RNL (6.13 ± 6.94 versus 15.86 ± 25.53) and CRP (4.47 ± 4.77 versus 8.67 ± 7.72) had higher averages in the group with severe COVID-19. Leukocytes and neutrophils presented an area under the ROC curve 0.747 ($p < 0.05$) and 0.777 ($p < 0.05$), respectively and RNL and PCR, presented, respectively, values of areas of 0.722 and 0.700. **Conclusion.** This study demonstrated that sex and origin can influence the severity of COVID-19, as well as laboratory parameters such as leukocytes, neutrophils, RNL and CRP when altered can predict the severity of the disease.

Keywords: Coronavirus. COVID-19. prognosis.

Introdução

O novo coronavírus, assim denominado, é cientificamente identificado como SARS-CoV-2, pertencente à família Coronaviridae, um betacoronavírus, sendo amplamente mais infeccioso que o SARS-CoV, tendo maior poder de virulência. A transmissão do SARS-CoV-2 ocorre através de gotículas respiratórias e em contato direto com os indivíduos ou fômites contaminados (LI *et al.*, 2020). Os sintomas causados pela COVID-19 vão desde febre, tosse seca, fadiga, desconforto respiratório, perda do olfato e paladar a uma síndrome respiratória severa e septicemia com falência múltipla de órgãos (LI *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2020).

O estado de quarentena e medidas de restrições completaram um ano em março de 2021, e mesmo diante das diversas orientações sanitárias e iniciação da vacinação, os números ainda são alarmantes. O Brasil conta com 14.9 milhões de casos positivos de COVID-19 e 412 mil mortes; mundialmente, tem-se 154.469.379 milhões de casos e 3.230.336 milhões mortes (05 de maio de 2021). No Brasil, a doença encontra-se na segunda onda, colapsando o sistema de saúde (BRASIL, 2021).

O mecanismo o qual o vírus age no organismo ainda não está totalmente elucidado, mas o SARS-CoV-2 demonstrou maior afinidade por um receptor no gene ACE2 para entrada na célula do hospedeiro, que faz parte do sistema renina-angiotensina (SRA), o qual é um dos responsáveis por manter o equilíbrio hidroeletrolítico e a homeostase dos níveis pressóricos (LI *et al.*, 2020; VABRET *et al.*, 2020).

O SARS-CoV-2 depende do organismo hospedeiro para completar seu ciclo de vida, assim, várias proteínas do coronavírus podem modificar o ambiente celular influenciando na patogênese viral, ativando ou neutralizando o sistema imunológico. A interação vírus-hospedeiro pode resultar na produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, sendo denominada tempestade de citocinas (HARTENIAN *et al.*, 2020).

Por se tratar de uma doença nova, métodos de diagnósticos e marcadores de acompanhamento/evolução da doença devem ser estudados e validados. Logo, além de métodos de diagnóstico da doença, buscam-se exames laboratoriais que possam prever a evolução dos pacientes, sobretudo os que estão em estado grave. Dentre os exames laboratoriais utilizados para acompanhamento do quadro clínico dos pacientes estão: a avaliação da coagulação sanguínea, através dos níveis de D-Dímero e fibrinogênio; avaliação dos parâmetros hematológicos e dosagem de marcadores inflamatórios, como citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ), Proteína C Reativa (PCR) e ferritina sérica; além do cálculo de relações como a Relação Neutrófilo-Linfócito (RNL) e Relação Plaqueta-Linfócito (RPL) (XAVIER *et al.*, 2020), que são biomarcadores inflamatórios recentes.

A infecção por SARS-CoV-2 traz como alterações hematológicas: leucocitose, linfopenia nos estágios iniciais da doença, neutrofilia e em alguns casos plaquetopenia. Além de alterações nos marcadores hematológicos, foram detectadas mudanças em biomarcadores como a PCR e a ferritina sérica. De acordo com Lippi e cols. (2020) (LIPPI *et al.*, 2020) a PCR está elevada em 75%-95% dos pacientes, principalmente na fase grave da doença.

Alguns estudos verificaram que pacientes com COVID-19 que foram a óbito apresentaram níveis mais elevados de contagem de leucócitos, neutrófilos, RNL e PCR, como também uma baixa contagem de plaquetas. Além disso, a contagem de neutrófilos, PCR, contagem de plaquetas e idade foram consideradas variáveis preditoras de evolução para o desfecho de óbito nesses pacientes (LIPPI *et al.*, 2020; LUO *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020). Da mesma forma, no estudo de Wang e cols. (2020) verificou-se que a PCR pode ser um marcador valioso para prever o agravamento da COVID-19.

Assim sendo, a PCR juntamente com os índices hematológicos podem ser preditores na análise evolutiva da COVID-19, principalmente quanto a avaliação do risco de óbito. Ademais, por se tratar de uma doença emergente e nova no contexto atual, faz-se necessário estudos que possibilitem a melhora dos métodos e protocolos clínicos de diagnóstico e acompanhamento do quadro evolutivo da doença. Diante disso, o presente estudo objetivou identificar as alterações em índices hematológicos e biomarcadores inflamatórios em pessoas com COVID-19, bem como verificar o poder de predição no prognóstico da doença.

Metodologia

Desenho e Local do Estudo

Este foi um estudo de caráter prospectivo e exploratório com pacientes adultos, residentes no Estado do Maranhão, com a infecção com SARS-CoV-2. O presente seguiu as normas de pesquisa em saúde com seres humanos de acordo com a Resolução CNS 466/2012 e possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos com parecer de número 4.157.769.

Foram arrolados para este trabalho pacientes confirmados para COVID-19 através da metodologia de RT-PCR (Reação da Transcriptase Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase) internados no Hospital Universitário Presidente Dutra da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA), durante o período março a setembro de 2020. Participaram desta pesquisa 136 adultos (18 a 80 anos), de ambos os sexos, em tratamento para a infecção pelo SARS-COV-2. Os critérios de inclusão foram: pacientes adultos que estavam em tratamento da infecção pelo SARS-CoV-2 no HU-UFMA. E como critérios de exclusão: menores de 18 anos, pessoas com imunodeficiência previamente diagnosticada e com síndrome gripal, mas RT-PCR negativa.

Os pacientes foram convidados a participar da pesquisa, com explanação dos seus objetivos e procedimentos a serem realizados. Os mesmos foram abordados no leito hospitalar juntamente com a Equipe de Enfermagem e/ou do Laboratório de Análises Clínicas do HUUFMA. Todos que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Coleta de Dados

Os participantes tiveram coletados dados de seus prontuários onde se buscou informações sobre idade, sexo, cor de pele, estado civil, local de origem e desfecho óbito ou

alta hospitalar. Também foram coletadas amostras de sangue periférico para realização de exames laboratoriais objetivando o acompanhamento da evolução do quadro clínico-laboratorial do participante.

Os exames laboratoriais realizados foram: hemograma completo, proteína C reativa e ferritina sérica. O hemograma e os parâmetros bioquímicos (PCR e ferritina) foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Presidente Dutra da Universidade Federal do Maranhão, utilizando métodos padronizados e amplamente utilizados na rotina laboratorial, com equipamento automatizado - COBAS 6000 (Roche), módulos 501 e 503, para as análises bioquímicas; e o equipamento ADVIA 2120 (*Hematology System by Siemens Healthineers*) para hemograma.

Análise estatística e aspectos éticos.

A análise dos dados foi realizada no programa estatístico IBM SPSS versão 24. Para análise univariada das variáveis categóricas foram utilizados os testes do qui-quadrado ou exato de Fisher. As variáveis significativas foram incluídas na análise multivariada através da Regressão Logística Binária, o modelo de regressão apresentou o odds-ratio bruto e o ajustado.

As variáveis numéricas foram testadas para a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis com distribuição normal foram submetidas ao teste t de *student* para amostras independentes e amostras não paramétricas foram analisadas com o teste de Mann-Whitney. Após os testes do t de *student* e de *Mann-Whitney*, as variáveis significativas, a nível de 95% de confiança, foram incluídas na construção de curvas ROC. Considerou-se para todas as análises o intervalo de confiança de 95%.

Os pacientes foram estratificados pela gravidade da COVID-19, sendo divididos em 2 grupos: Grupo 1: COVID-19 não severa (56 pacientes) e Grupo 2: COVID-19 Severa (80 pacientes). Essa estratificação foi baseada no estudo de Wang *et al.*, (2020), o qual para determinação da severidade da COVID-19 utilizou-se um dos critérios: 1-frequência respiratória ≥ 30 /minutos; 2-saturação de oxigênio $\leq 93\%$; 3- $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$ mmHg; 4-lesões pulmonares progrediram $> 50\%$ em 24-48 horas; 5-ventilação mecânica implementada; 6-choque; e 7-cuidados intensivos na unidade de admissão. Conforme citado anteriormente, considerou-se com COVID-19 Severa os pacientes que atendiam dois dos critérios do artigo de Wang *et al.*, (2020) (WANG *et al.*, 2020).

Resultados

Trata-se de um estudo com 136 pacientes de ambos os sexos, positivos para o SARS-CoV-2, internados no Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão. A amostra estudada demonstrou predominância de participantes do sexo masculino (58.8%), com idade menor ou igual a 60 anos (54.4%) e estado civil solteiro/separado/viúvo (63.2%). Ainda, a cor preponderante da pele foi a parda (44.9%) e procedência majoritariamente da capital São Luís (58.1%). No que concerne o número de óbitos, observou-se que 23.5% dos participantes tiveram esse desfecho. As variáveis: sexo, cor de pele, procedência e óbito, foram significativas a nível de $p < 0.05$ entre os grupos G1 (COVID-19 severa) e G2 (COVID-19 não severa). Dados apresentados em formato de proporção na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição de dados sociodemográficos de pacientes positivos para SARS-COV-2 internados no Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão, conforme a severidade da doença. São Luís/MA - 2020.

Variáveis	Total (136)	COVID-19 Não Severa (56)	COVID-19 Severa (80)
Sexo *			
Feminino	56 (41.2%)	28 (50%)	28 (35%)
Masculino	80 (58.8%)	28 (50%)	52 (65%)
Idade			
≤60 anos	74 (54.4%)	34 (60.7%)	40 (50%)
>60 anos	62 (45.6%)	22 (39.3%)	40 (50%)
Estado Civil			
Casado/União Estável	50 (36.76%)	16 (28,57%)	34 (42,5%)
Solteiro/Separado/Viúvo	86 (63.24%)	40 (71.43%)	46 (57.5%)
Cor da Pele*			
Branca	59 (43.4%)	26 (46.4%)	33 (41.3%)
Preta	4 (2.9%)	3 (5.4%)	1 (1.3%)
Parda	61 (44.9%)	19 (33.9%)	42 (52.5%)
Outras	12 (8.8%)	8 (14.3%)	4 (5%)
Procedência*			

Interior	57 (41.9%)	32 (57.1%)	25 (31.3%)
Capital	79 (58.1%)	24 (42.9%)	55 (68.8%)
Óbito*			
Não	104 (76.5%)	53 (94.6%)	51 (63.8%)
Sim	32 (23.5%)	3 (5.4%)	29 (36.3%)

Dados apresentados em formato de proporção. Comparação dos grupos: teste do qui-quadrado ou exato de Fisher. * $p < 0.05$

As variáveis significativas (sexo, cor de pele e procedência) na análise univariada foram incluídas na análise multivariada através da regressão logística binária. O óbito não foi considerado para análise, por ser uma variável de confusão, visto que o desfecho de óbito para a COVID-19 pode ser por diversos fatores que não envolvem somente a doença, mas também disponibilização de leitos hospitalares, recursos econômicos do centro de tratamento, dentre outros.

Ao avaliar o modelo de regressão, foi possível verificar que o sexo se manteve significativo na análise multivariada, demonstrando que pertencer ao sexo masculino aumentou em 2.402 ($p < 0.05$) vezes a chance da COVID-19 ser severa. Por outro lado, a cor da pele não apresentou significância na análise multivariada ($p > 0.05$). Quanto a procedência, pacientes oriundos da capital possuem 2.780 mais chances de possuírem COVID-19 severa ($p < 0.05$) quando comparado aos pacientes do interior (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de variáveis preditoras para o desfecho de COVID-19 severa através da regressão logística binária. São Luís/MA – 2020.

COVID-19 Severa				
	<i>Odds ratio bruta- IC (95%)</i>	<i>Odds ratio ajustada-IC (95%)</i>	<i>Wald</i>	<i>P-valor</i>
<i>Sexo</i>				
<i>Feminino</i>	Referência	-	-	-
<i>Masculino</i>	1.857 (0.925-3.728)	2.402 (1.114-5.181)	4.994	0.02
<i>Cor</i>				
<i>Branca</i>	Referência	-	-	-
<i>Preta</i>	-	2.888 (0.557-9.396)	1.319	0.2
<i>Parda</i>	-	0.714 (0.55-9.351)	0.066	0.7
<i>Outras</i>	-	4.013 (1-16.107)	3.841	0.6
<i>Procedência</i>				
<i>Interior</i>	Referência	-	-	-
<i>Capital</i>	10.046 (2.880-35.0339)	2.780 (1.282-6.029)	6.699	0.01

Os achados laboratoriais estratificados pela severidade na doença estão demonstrados na Tabela 3. Os parâmetros hematológicos eritrócitos (3.89 ± 0.79 versus 3.68 ± 0.79), hemoglobina (10.82 ± 2.13 versus 10.45 ± 2.06) e hematócrito (33.78 ± 6.18 versus 33.02 ± 6.24) apresentaram valores médios maiores no Grupo 1 (COVID-19 não severa), mas sem significância estatística ($p > 0.05$).

O número de leucócitos (7598.51 ± 3530 versus 13085 ± 7985) e neutrófilos (5349.18 ± 3565 versus 21910.75 ± 6808) tiveram maiores médias no Grupo 2 (COVID-19 severa), com diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$). O número de linfócitos (1610.25 ± 1248 versus 1030.36 ± 524) não apresentou significância estatística ($p > 0.05$) quando da comparação entre os grupos. As plaquetas (315446 ± 16342 versus 4051186 ± 66187) demonstraram maior valor médio no Grupo 1, contudo não apresentou significância estatística ($p > 0.05$).

No que tange aos biomarcadores inflamatórios a relação neutrófilo-linfócito - RNL (6.13 ± 6.94 versus 15.86 ± 25.53) exibiu maior valor de média no Grupo 2, com significância estatística ($p < 0.05$). Assim como a relação plaquetas-linfócitos - RPL (315446 ± 16342 versus

468.41±1161) teve maior média no Grupo 2, porém sem significância estatisticamente ($p>0.05$). Da mesma forma, a Proteína C Reativa (4.47±4.77 versus 8.67±7.72) evidenciou maior média no Grupo 2, também significativo estatisticamente ($p<0.05$). Entretanto, a ferritina (1053.95±534 versus 1312.93±1202), embora tenha tido maior valor de média no Grupo 2 não foi diferente estatisticamente entre os grupos ($p<0.05$). Dados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Caracterização dos parâmetros hematológicos e biomarcadores inflamatórios de pacientes positivos para SARS-COV-2 internados no Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão, conforme a severidade da doença. São Luís/MA - 2020.

Variáveis	Total (136)	COVID-19	COVID-19
		Não Severa (56)	Severa (80)
Eritrócitos (milhões/mm ³)	3.76±0.79	3.89±0.79	3.68±0.79
Hemoglobina (g/dL)	10.60±2.09	10.82±2.13	10.45±2.06
Hematócrito (%)	33.31±6.20	33.78±6.18	33.02±6.24
Leucócitos* (p/mm ³)	10971.63±7136.09	7598.51±3530	13085±7985
Neutrófilos* (p/mm ³)	15530.47±53899	5349.18±3565	21910.75±6808
Linfócitos (p/mm ³)	1266.61±932	1610.25±1248	1030.36±524
Plaquetas (p/mm ³)	370614.81±52914	315446±16342	4051186±66187
Relação Plaquetas- Linfócitos	408.55±928.8	312.25±278.72	468.41±1161
Relação Neutrófilo- Linfócito*	12.13±20.99	6.13±6.94	15.86±25.53
Proteína C Reativa* (mg/dL)	7.22±7.10	4.47±4.77	8.67±7.72
Ferritina (ng/mL)	1268.84±1117	1053.95±534	1312.93±1202

Dados apresentados em formato de média e desvio padrão. Comparação dos grupos: teste t de student ou teste de Mann-Whitney. * $p<0.05$

As variáveis significativas pelo teste t de *student* ou *Mann-Whitney* (leucócitos, neutrófilos, PCR e RNL) foram incluídas em uma análise de curva ROC para verificar a sensibilidade e especificidade de cada marcador (Figura 1). O número total de leucócitos e

neutrófilos apresentaram área sob a curva 0.747 ($p<0.05$) e 0.777 ($p<0.05$), respectivamente, tendo um bom poder de discriminação. A Figura 1 apresenta a curva ROC dos biomarcadores inflamatórios (RNL e PCR). A RNL demonstrou ter bom poder discriminatório na predição de severidade da COVID-19, com um valor de área de 0.722 ($p<0.05$), assim como a PCR, visto que sua área foi 0.700 ($p<0.05$).

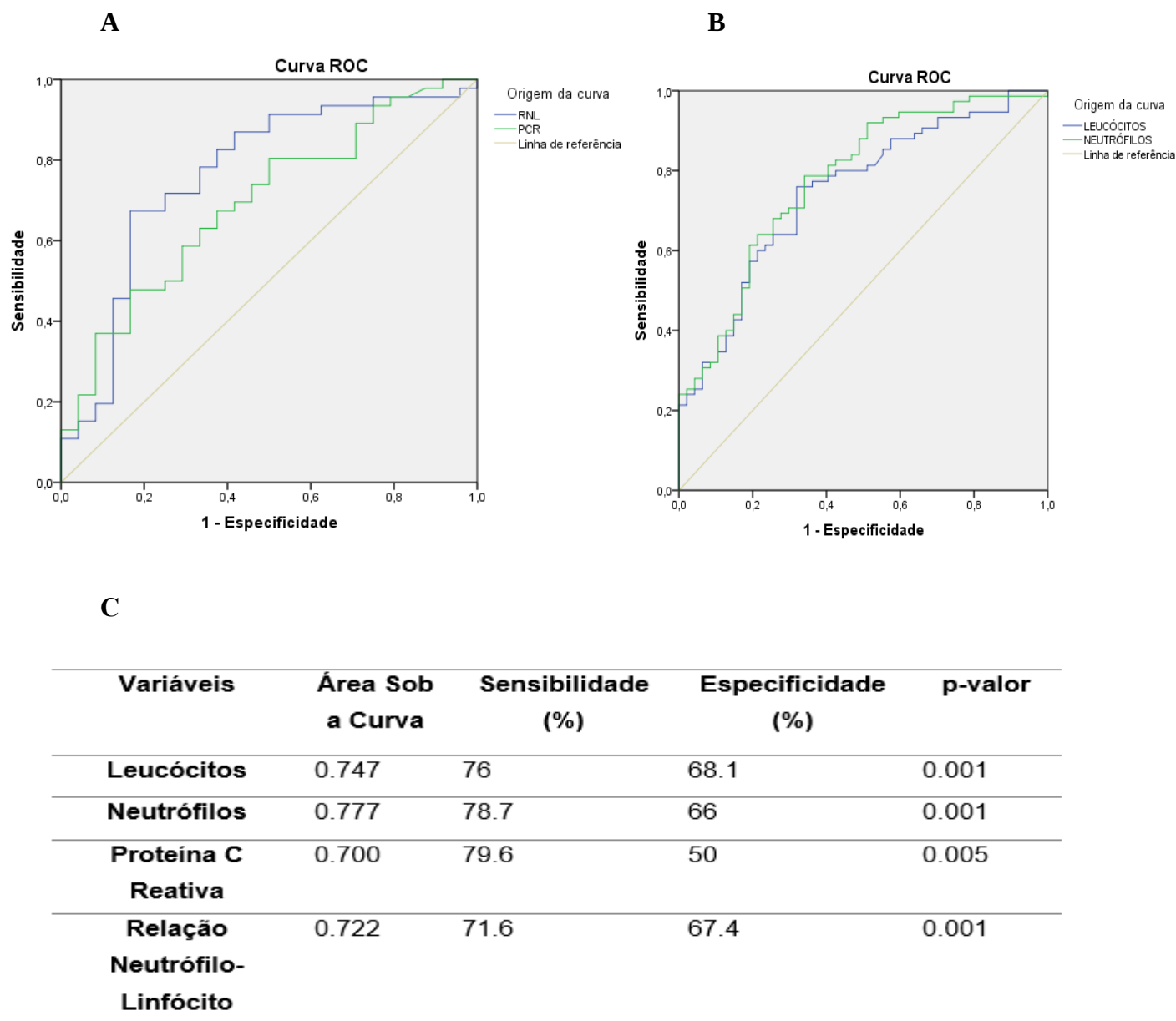


Figura 1. **A.** Análise da Curva ROC do poder de discriminação dos parâmetros hematológicos Leucócitos e Neutrófilos quanto a COVID-19 em estágio severo/grave. **B.** Análise da Curva ROC do poder discriminatórios dos marcadores inflamatórios Relação Neutrófilo-Linfócito e Proteína C Reativa quanto a COVID-19 em estágio severo/grave. **C.** Sensibilidade e Especificidade de parâmetros hematológicos e Marcadores Laboratoriais na Predição da COVID-19 Severa.

Discussão

Por ser uma doença emergente, as diretrizes e protocolos clínicos de gravidade da COVID-19 ainda são pouco esclarecedores e escassos. Identificar adequadamente a gravidade do paciente e acompanhar seu quadro clínico é fundamental para definição do tratamento adequado, e os marcadores laboratoriais podem ajudar nesse processo de acompanhamento e prognóstico da doença.

No presente estudo o sexo masculino apresentou preponderância nos casos de COVID-19 severa. Como os dados aqui apresentados são do início da pandemia até setembro de 2020, estudos do mesmo período como o de Gebhard *et al.* (2020) e Guan *et al.* (2020) apresentaram resultados que mostram um desequilíbrio entre o sexo quanto a gravidade da COVID-19, demonstrando um aumento da letalidade em pacientes masculinos.

Gebhard *et al.* (2020) demonstraram que os níveis circulantes do receptor ACE2 são maiores em homens saudáveis e em pacientes diabéticos, podendo corroborar para a gravidade do quadro. De acordo com o estudo de Samuel *et al.* (2020), pode haver uma relação entre a sinalização androgênica e a COVID-19, visto que o SARS-CoV-2 utiliza como mecanismo de ação os receptores ACE2 e a serina protease transmembrana da superfície celular (TMPRSS2), ambas reguladas por andrógenos, assim, ainda segundo os autores, os níveis de ACE2 são mais elevados em homens, podendo corroborar com o aumento da letalidade nesses pacientes, uma vez que o vírus teria maior número de sítios de ligação e entrada no organismo humano. Além disso, Samuel *et al.* (2020) verificam que a doença da próstata pode ser um fator de risco para homens, pois aumentam o número de andrógenos no organismo.

Outro fator interessante no estudo foi a diferença observada entre pacientes do interior e da capital, os pacientes da capital apresentaram maior gravidade da doença. É válido ressaltar que o período da pesquisa pode contribuir para o achado, tendo em vista a alta taxa de infecção no interior ter iniciado mais tarde; por exemplo, o estudo de Galvão e Roncalli *et al.* (2020), em levantamento realizado com casos notificados de COVID-19 de março a agosto de 2020 no Rio Grande do Norte, evidenciaram que os pacientes com origem do interior tiveram 0,66 menos chance de desfecho óbito pelo novo coronavírus.

No que se refere aos dados hematológicos, as contagens de leucócitos e neutrófilos foram significativamente maiores no grupo com a COVID-19 severa. Estudos demonstraram que pacientes com a COVID-19 grave apresentaram os seguintes dados laboratoriais: a alta contagem de leucócitos e neutrófilos, significativamente diferentes quando em comparação com os pacientes com a doença não grave (CEREVAC *et al.*, 2021). De acordo com Rahi *et*

al. (2020) há uma desregulação do sistema imunológico que aumenta a produção de neutrófilos e a apoptose de linfócitos. Ainda, segundo Cavalcante-Silva *et al.* (2021) os neutrófilos aumentam as defesas antivirais, pela interação com outras células imunes, participando até mesmo da liberação de citocinas inflamatória, bem como a neutrofilia pode se desenvolver devido a uma infecção bacteriana secundária nos pacientes graves, como também a alta resposta inflamatória induz uma maior infiltração de neutrófilos no parênquima pulmonar (RAHI *et al.*, 2020; ARYAL *et al.*, 2020).

Ao analisar a curva ROC destes parâmetros hematológicos (leucócitos e neutrófilos), foi possível verificar que ambos possuem um bom poder de discriminação quanto a severidade da COVID-19. Além disso, esses parâmetros possuem uma boa sensibilidade, logo, acompanhá-los pode melhorar o desfecho dos casos, como por exemplo o envio precoce para a Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Assim sendo, verificar continuamente esses parâmetros pode contribuir para o acompanhamento da lesão pulmonar.

De acordo com Wang *et al.* (2020), o aumento de neutrófilos coincide com a lesão pulmonar em pacientes com a COVID-19 grave. O aumento exacerbado e prologando do número de neutrófilos pode prejudicar o organismo do paciente, tendo em vista que ocorre a liberação moléculas tóxicas, como radicais superóxidos, que contribuem para o estresse oxidativo e consequentemente o estabelecimento do quadro de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) (CAVALCANTE-SILVA *et al.*, 2021).

O estado inflamatório exacerbado causado pelo SARS-CoV-2, leva ao aumento da interação entre macrófagos e monócitos, bem como ativação endotelial. Além da liberação de citocinas IL-6, TNF, IL-8, IL-10, IL-1RA, as quais predispõe alteração no coagulograma e em biomarcadores inflamatórios. Anormalidades nos biomarcadores inflamatórios como a Proteína C Reativa e a Relação Neutrófilo-Linfócito são achados laboratoriais importantes em pacientes com a COVID-19 grave (CAVALCANTE-SILVA *et al.*, 2021). Neste estudo, a PCR e a RNL foram considerados bons preditores no desfecho da COVID-19 severa. De acordo com Ruan *et al.* (2020) pacientes que não sobreviveram a COVID-19 possuíam um aumento de 3 vezes nos níveis de Proteína C Reativa. Rahi *et al.* (2020) afirma que a PCR foi sugerida como um indicador confiável para identificação da gravidade do novo coronavírus.

No estudo de Ali *et al.* (2020) foi verificado que 86% dos pacientes com COVID-19 grave possuíam níveis elevados de PCR. Segundo Luo *et al.* (2020) a PCR foi um preditor independente da doença grave/crítica. Esta proteína é liberada rapidamente após o início da inflamação, liga-se a patógenos favorecendo a eliminação pelas células fagocíticas, podendo

fazer parte da primeira linha de defesa do sistema imunológico do paciente, mas este mecanismo ainda não está bem esclarecido (LUO *et al.*, 2020).

A RNL é um marcador recente de processos inflamatórios e tem sido estudado nas doenças renais, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e nos cânceres. No estudo de Fu *et al.* (2020) os níveis de RNL foram significativamente maiores no grupo de COVID-19 grave quando comparado ao grupo de COVID-19 leve/moderada, conseguindo assim, distinguir casos graves dos leves/moderados. Luo *et al.* (2020) demonstraram que a RNL apresentou maior valor nos pacientes que não sobreviveram à doença. Alguns trabalhos, ao estudarem a RNL como biomarcador de prognóstico da gravidade da COVID-19, afirmaram que esse biomarcador pode ser utilizado em um prognóstico precoce, em conjunto com outros marcadores, dado seu baixo custo e acessibilidade (BASBUS *et al.*, 2020, LIU *et al.*, 2020; CHOWDHURY *et al.*, 2021).

Além disso, Liu *et al.* (2020) (LIU *et al.*, 2020) afirmaram que pacientes com diabetes mellitus e positivos para o vírus SARSCoV-2, e como RNL alterada apresentaram maior gravidade no quadro evolutivo da doença, bem como maior tempo de permanência no hospital. De acordo com Cavalcante-Silva *et al.* (2021), a alteração da RNL pode ser vista como um biomarcador que corrobora com a ideia de que a inflamação crônica pré-existente afeta de maneira significativa na severidade da COVID-19. Logo, o aumento da RNL pode ocorrer devido a fatores como alta liberação de citocinas, bem como pelo aumento exacerbado de neutrófilos, e pela morte dos linfócitos ocorrida devido a regulação positiva dos genes envolvidos na via de morte celular, decorrente do próprio mecanismo de ação do SARS-CoV-2 no organismo (PONTI *et al.*, 2020).

As limitações deste estudo incluem um número restrito de participantes, mas esses são representantes do início da pandemia de COVID-19, podendo assim servir de base para estudos comparativos sobre a COVID-19 em períodos distintos dela. Além disso, pode-se citar a necessidade da realização da cinética desses marcadores a fim de se avaliar adequadamente um melhor biomarcador de gravidade e/ou prognóstico da doença.

Conclusão

Baseado nos dados apresentados, podemos incentivar o uso de parâmetros hematológicos como a contagem de leucócitos e neutrófilos e de marcadores inflamatórios como a proteína C reativa e a relação neutrófilo-linfócito para o prognóstico da severidade da COVID-19.

Financiamento

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

Agradecimentos

Agradecemos a todos que aceitaram participar dessa pesquisa e por terem compartilhado um pouco da sua história conosco. Agradecemos ainda ao Hospital Universitário e ao Programa de Pós-Graduação Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão pelo apoio técnico.

Referências

- ALI, Nurshad. Elevated level of C-reactive protein may be an early marker to predict risk for severity of COVID-19. **Journal of medical virology**, 2020.
- ARYAL, Madan Raj *et al.* Venous thromboembolism in COVID-19: towards an ideal approach to thromboprophylaxis, screening, and treatment. **Current cardiology reports**, v. 22, n. 7, p. 1-5, 2020.
- BASBUS, Luis *et al.* Índice neutrófilo-linfócito como factor pronóstico de COVID-19. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 80, p. 31-36, 2020.
- BRASIL. Coronavírus. Painel de Coronavírus. Disponível em: < <https://covid.saude.gov.br/> >. Acesso em: 05 de maio de 2021.
- CAVALCANTE-SILVA, Luiz Henrique Agra *et al.* Neutrophils and COVID-19: The road so far. **International immunopharmacology**, v. 90, p. 107233, 2021.
- CEKEREVAC, Ivan *et al.* Predicting severity and intrahospital mortality in COVID-19: the place and role of oxidative stress. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2021, 2021.
- CHOWDHURY, Abu Taiub Mohammed Mohiuddin *et al.* Analysis of the primary presenting symptoms and hematological findings of COVID-19 patients in Bangladesh. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 15, n. 02, p. 214-223, 2021.
- FU, Jianhong *et al.* The clinical implication of dynamic neutrophil to lymphocyte ratio and D-dimer in COVID-19: A retrospective study in Suzhou China. **Thrombosis research**, v. 192, p. 3-8, 2020.
- GALVÃO, Maria Helena Rodrigues; RONCALLI, Angelo Giuseppe. Fatores associados a maior risco de ocorrência de óbito por COVID-19: análise de sobrevivência com base em casos confirmados. **Revista brasileira de epidemiologia**, v. 23, 2021.
- GEBHARD, Catherine *et al.* Impact of sex and gender on COVID-19 outcomes in Europe. **Biology of sex differences**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2020.

GUAN, Yanjun; DENG, Hong; ZHOU, Xinyi. Understanding the impact of the COVID-19 pandemic on career development: Insights from cultural psychology. **Journal of vocational behavior**, v. 119, p. 103438, 2020.

HARTENIAN, Ella *et al.* The molecular virology of coronaviruses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 37, p. 12910-12934, 2020.

KOPEL, Jonathan *et al.* Racial and gender-based differences in COVID-19. **Frontiers in public health**, v. 8, p. 418, 2020.

LI, Yanwei *et al.* Physiological and pathological regulation of ACE2, the SARS-CoV-2 receptor. **Pharmacological research**, v. 157, p. 104833, 2020.

LIPPI, Giuseppe; PLEBANI, Mario. Procalcitonin in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 505, p. 190, 2020.

LIU, Gaoli *et al.* The role of neutrophil-lymphocyte ratio and lymphocyte-monocyte ratio in the prognosis of type 2 diabetics with COVID-19. **Scottish Medical Journal**, v. 65, n. 4, p. 154-160, 2020.

LUO, Xiaomin *et al.* Prognostic value of C-reactive protein in patients with coronavirus 2019. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 16, p. 2174-2179, 2020.

PONTI, Giovanni *et al.* Biomarkers associated with COVID-19 disease progression. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 57, n. 6, p. 389-399, 2020.

RAHI, Mandeep Singh *et al.* Hematologic disorders associated with COVID-19: a review. **Annals of hematology**, v. 100, n. 2, p. 309-320, 2021.

RUAN, Qiurong *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**, v. 46, n. 5, p. 846-848, 2020.

SAMUEL, Ryan M. *et al.* Androgen signaling regulates SARS-CoV-2 receptor levels and is associated with severe COVID-19 symptoms in men. **Cell Stem Cell**, v. 27, n. 6, p. 876-889. e12, 2020.

SOBHANI, Sahar *et al.* Association between clinical characteristics and laboratory findings with outcome of hospitalized COVID-19 patients: a report from Northeast Iran. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2021, 2021.

VABRET, Nicolas *et al.* Immunology of COVID-19: current state of the science. **Immunity**, v. 52, n. 6, p. 910-941, 2020.

WANG, Guyi *et al.* C-reactive protein level may predict the risk of COVID-19 aggravation. In: **Open forum infectious diseases**. US: Oxford University Press, 2020. p. ofaa153.

WANG, Jun *et al.* Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps in COVID-19. **Frontiers in immunology**, p. 2063, 2020.

XAVIER, Analucia R. *et al.* COVID-19: manifestações clínicas e laboratoriais na infecção pelo novo coronavírus. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 56, 2020.

YANG, Chu-Wen; CHEN, Mei-Fang. Composition of human-specific slow codons and slow di-codons in SARS-CoV and 2019-nCoV are lower than other coronaviruses suggesting a faster protein synthesis rate of SARS-CoV and 2019-nCoV. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 53, n. 3, p. 419-424, 2020.

4.2 Artigo

Revista de Submissão: Journal of Medical Virology

Fator de impacto / 2021: 2,327

Qualis Novo: B1

Qualis vigente: B1 MEDII

PERFIL DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NA INFECÇÃO AGUDA POR SARS-CoV-2 EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA REGIÃO DA AMAZÔNIA LEGAL, BRASIL.

Alice de Sá Ferreira, Alessandra Costa de Sales Muniz, Ana Cléa Cutrim Diniz de Moraes, Ana Carolina Campi-Azevedo, Carla Déa Trindade Barbosa, Elaine Speziali de Faria, Karina Donato Fook, Mônica Machado de Carvalho, Déborah Rocha de Araújo Gome, Malene Lima Gomes Sodré, Marilde Abreu Mendonça, Mateus Fontenelle, Lucas Carreiro de Freitas, Lucas Mateus Almeida Pereira, Maria Fernanda Lima Bertolaccini, Ilka Kassandra Pereira Belfort, Andrea Teixeira de Carvalho e Sally Cristina Moutinho Monteiro.

Correspondente: Alice de Sá Ferreira, Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão.

E-mail: ferreiraalicedesa@gmail.com.

Resumo

Introdução. A COVID-19 é uma doença infecciosa causada pelo vírus SARS-CoV-2, o qual está associado a elevada mortalidade por exacerbação da resposta inflamatória, que leva a um fenômeno denominado tempestade de citocinas. **Objetivo.** Analisar a presença de citocinas pró-inflamatórias em um grupo de pessoas hospitalizadas devido a COVID-19 e verificar o poder de predição dessas citocinas quanto ao prognóstico de gravidade da doença. **Métodos.** Trata-se de estudo translacional, prospectivo e exploratório com pessoas adultas, residentes em uma região da Amazônia Legal, sendo realizado no Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão – HUUFMA, no período de março a dezembro de 2020. A determinação sérica de citocinas pró-inflamatórias foi realizada no ensaio Luminex 27-plex Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Os participantes foram divididos em três grupos, o

Controle (Negativos para COVID-19) e de acordo com a gravidade da doença (COVID-19 moderada e COVID-19 grave). Os dados foram analisados utilizando-se o software programa estatístico GraphPad Prism® versão 8. com nível de significância de 0,05. **Resultados.** A amostra foi composta 33 pacientes no grupo controle (negativos para COVID-19 pela RT-PCR) e por 51 pacientes positivos para COVID-19 (RT-PCR positiva), sendo 15 pacientes pertencentes ao Grupo Moderado e 36 pertencentes ao Grupo Grave. O poder de predição das citocinas pró-inflamatórias em diferenciar os casos moderados dos graves na COVID-19, foi apresentado em modelos de curva ROC. A IL-6 apresentou área sob a curva (AUC) de 0,727, com ponto de corte $> 0,93$, a IL-16 AUC de 0,740, com ponto de corte $> 33,55$ e o IFN- $\alpha 2$ AUC de 0,727, com ponto de corte $> 3,06$ demonstrando serem bons preditores de gravidade da COVID. **Conclusão.** Este estudo demonstrou que as citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-16 e IFN- $\alpha 2$ podem ser utilizados como biomarcadores para predizer casos graves da COVID-19 podendo auxiliar no manejo clínico dos pacientes.

Palavras-Chave: COVID-19. Citocinas. Severidade.

Abstract

Introduction. COVID-19 is an infectious disease caused by the SARS-CoV-2 virus, a betacoronavirus that infects respiratory tract cells and has a high contagious and inflammatory power. High mortality is associated with exacerbation of the inflammatory response, induced by the virus, which leads to a phenomenon called cytokine storm. **Goal.** To analyze the presence of pro-inflammatory cytokines in a group of people hospitalized due to COVID-19 and verify the predicting power of these cytokines regarding the prognosis of disease severity. **Methods.** This is a translational, prospective and exploratory study with adult people living in a region of the Legal Amazon, being conducted at the University Hospital of the Federal University of Maranhão - HUUFMA, from March to December 2020. The determination of the Pro-inflammatory cytokines was performed in the Luminex 27-plex Assay assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The participants were divided into three groups, the Control group (Negative for COVID-19) and according to the severity of the disease (moderate COVID-19 and severe COVID-19). The data were analyzed using the statistical program software GraphPad Prism version® 8. significance level of 0.05. **Findings.** The sample consisted of 33 patients in the control group (negative for COVID-19 by RT-PCR) and 51 patients positive for COVID-19 (positive RT-PCR), 15 patients belonging to the Moderate Group and 36

belonging to the Severe Group. The predicting power of pro-inflammatory cytokines to differentiate moderate from severe cases in COVID-19, was presented in ROC curve models, so IL-6 presented an area under the curve (AUC) of 0.727, with cutoff point > 0.93 , IL-16 AUC of 0.740, with cutoff point > 33.55 and IFN-Alpha2 AUC of 0.727, with cutoff point > 3.06 , demonstrating to be good predictors of covid severity. **Conclusion.** This study demonstrated that the pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-16 and IFN-Alfa2 can predict severe cases of COVID-19 and may help in the clinical management of the patient.

Keywords: COVID-19. Cytokines. Severity.

Introdução

A COVID-19 é uma doença infecciosa causada pelo vírus SARS-CoV-2, um betacoronavírus que infecta as células do trato respiratório, tendo um alto poder contagioso e inflamatório.¹ A infecção pelo vírus pode se apresentar com sintomas leves ou progredir para a síndrome respiratória aguda grave (SRAG), injúria cardíaca, coagulopatia, disfunção renal, hepática e/ou gastrointestinal; além de alta taxa de mortalidade.²

A elevada mortalidade está associada a exacerbação da resposta inflamatória, induzida pelo vírus, que leva a um fenômeno denominado tempestade de citocinas. Na tempestade de citocinas há uma falha nos mecanismos de regulação da homeostase entre a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.³ Essa falha origina uma ativação persistente e sustentada do sistema imunológico com níveis elevados de citocinas circulantes e hiperativação de células imunes, com consequente dano nos pulmões e outros tecidos, podendo levar a falência múltipla de órgãos e/ou óbito.^{3,4}

De acordo com as evidências científicas, a gravidade da infecção está relacionada a expressão exacerbada de citocinas inflamatórias e resposta imune desregulada, sendo associado com SRAG e falência de órgãos. Níveis elevados de IL-1B (Interleucina 1 beta), IFN-gama (Interferon Gama), IP-10 (Ligante 10 de quimiocina com motivo C-X-X) e MCP-1 (Proteínas Quimiotática de Monócitos 1), podem ativar a resposta das células helper tipo 1 (Th1). Além disso, há liberação de citocinas pró-inflamatórias como: interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa).⁵

Chen e cols. (2020)⁵ verificaram que níveis séricos de interleucina 2R (IL-2R) e IL-6 estão correlacionados positivamente com a gravidade da COVID-19 e Huang e cols. (2020)² observaram que as concentrações de IL-2, IL-7, IL-10, GSCF, IP10, MCP1, MIP1A e TNF-

alfa encontravam-se mais elevadas em pacientes com COVID-19 internados na unidade de terapia intensiva quando comparado aos pacientes internados na enfermaria.

Níveis exacerbados de citocinas como IL-6, MCP-1, TNF-alfa,⁶ IL-1 α , receptor de IL-2 (IL-2R), IL-3, IL-7, IL-8, IL-18, TNF- alfa⁷ também foram correlacionadas com pior prognóstico da doença. Ademais, Jing e cols. (2022)⁷ também citam que a IL-6 é reconhecida como uma citocina altamente associada a COVID-19, visto que pode ser detectada ainda no início dos sintomas, podendo ser um biomarcador precoce para predição da gravidade da doença, juntamente com IL-16, IL-18, TNF-alfa.

Sabendo que a COVID-19 é uma doença nova e que causou o óbito de milhares de pessoas pelo mundo há necessidade de melhor entender o mecanismo inflamatório na doença, principalmente no que diz respeito ao perfil de liberação de citocinas, o qual vem sendo associado a desfechos desfavoráveis para o paciente. Dessa maneira, o objetivo do presente estudo foi analisar a presença de citocinas pró-inflamatórias em um grupo de pessoas hospitalizadas devido a COVID-19 e verificar o poder de predição dessas citocinas quanto ao prognóstico de severidade da doença.

Metodologia

Tipo de Estudo e Participantes

Trata-se de estudo translacional, prospectivo e exploratório com pessoas adultas, residentes em uma região da Amazônia Legal do Brasil, sendo realizado no Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão – HUUFMA, no período de março a dezembro de 2020. O grupo de estudo foi composto por amostras de soro de 33 pessoas negativas para o vírus e 51 pessoas internadas no HUUFMA positivas para COVID-19, com a metodologia RT-PCR.

O HUUFMA é um hospital público formado pelas unidades: Presidente Dutra e Materno Infantil, totalizando 554 leitos (Enfermaria + unidade de terapia intensiva - UTI) sendo um hospital de grande porte disponibilizando serviços de alta complexidade como transplantes, cirurgia cardiovascular, hemodinâmica, traumatologia e UTI neonatal.

Os participantes foram estratificados de acordo com a gravidade da doença. Esta estratificação se baseou no atendimento de pelo menos dois critérios sugeridos no estudo de Wang *et al.*, (2020)⁸, o qual para determinação da gravidade da COVID-19 utilizou-se um dos critérios: 1-frequência respiratória ≥ 30 /minutos; 2-saturação de oxigênio $\leq 93\%$; 3-PaO₂/FiO₂ ≤ 300 mmHg; 4-progressão de lesões pulmonares $>50\%$ em 24-48 horas; 5-

ventilação mecânica implementada; 6-choque; e 7-admissão na unidade de cuidados intensivos. Dessa forma, o estudo se dividiu em: grupo Controle (33 pacientes negativos para SARS-CoV-2 pareados em idade e sexo), grupo Moderado (15 pacientes positivos para SARS-CoV-2) e grupo Grave (36 pacientes positivos para SARS-CoV-2).

Foram coletadas informações dos prontuários hospitalares sobre dados demográficos, data de início de sintomas, necessidade de ventilação mecânica, necessidade de cuidados intensivos, alta/óbito. Não foram incluídos no estudo pessoas com doença autoimune ou imunocomprometidas, usuárias de medicamentos imunossupressores e pessoas em coma (induzido ou não).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUUFMA (parecer no. 4.157.769 e C.A.E.E. 32226420.9.0000.5086) e todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), de acordo com a Resolução CNS 466/2012 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde (CNS) do Brasil.

Análises Laboratoriais

Amostras de sangue periférico, para obtenção do soro, foram coletadas para a determinação de citocinas. Essa análise foi realizada no Instituto René-Rachou na Fiocruz de Minas Gerais utilizando o ensaio Luminex 27-plex Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) para detecção e quantificação simultânea de citocinas pró-inflamatórias, incluindo: Interleucina 6 (IL-6), Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-alfa), Interferon Alfa-2 (IFN-alfa2), Interleucina 12p40 (IL-12p40), Interferon Gama (IFN-Gama), Fator de Necrose Tumoral Beta (TNF-Beta), Interleucina 18 (IL-18), Interleucina IL-2R alfa (IL-2R alfa) e Interleucina IL-16 (IL-16). As amostras de soro dos pacientes foram diluídas duas vezes e analisadas de acordo com as instruções do fabricante. A mediana fluorescente e a intensidade da luz foi determinada para cada biomarcador usando Software Luminex xPONENT versão 3.1 (Merck Millipore, Billerica, CA, EUA). Curvas padrão foram geradas para cada biomarcador usando diluições seriais quádruplas manuais. As concentrações do biomarcador foram calculadas com base na curva padrão adquirida com Bio-Plex Software gerenciador versão 6.1 (Bio-Rad) usando uma curva de ajuste logístico do 5º parâmetro.

Análises dos Dados

Utilizou-se o teste do qui-quadrado para verificar a diferença entre as proporções dos grupos de pacientes com COVID-19 em estado moderado e em estado grave. Para avaliar o

perfil de citocinas pró-inflamatórias foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para mais de três grupos, sendo comparado três grupos, um grupo controle composto por pacientes negativos para COVID-19, um grupo com infecção em estado moderado e um grupo com infecção em severidade grave, a análise foi realizada com a fase inicial da infecção, ou seja, considerada até 7 dias após o início dos sintomas. Ainda, para verificar a diferença existentes entre os grupos quanto aos níveis de citocinas foi utilizado o teste post-hoc de Dunn. Para todas as análises adotou-se um valor de significância de 0,05. As amostras foram avaliadas no programa estatístico GraphPad Prism® versão 8.

Resultados

A amostra foi composta por 33 amostras de pacientes negativos para COVID-19 (controle negativo) e 51 de pacientes positivos para COVID-19 (RT-PCR). Dentre os positivos para COVID-19, 15 pertencentes ao Grupo Moderado e 36 ao Grupo Grave, com predominância do sexo masculino (60,8%), estado civil casado/união estável (78,4%), cor da pele preta/parda (68,6%) e com grau de escolaridade majoritariamente analfabeto (70,6%). Dentre os participantes 17,6% foram a óbito. Dados apresentados na Tabela 01.

Na análise do perfil de citocinas verificou-se que a IL-6 apresentou diferença significativa quando comparada a mediana nos três grupos, sendo o grupo com COVID-19 grave o que demonstrou maior valor dessa citocina (3,15 pg/mL; IC95% 0,31-81,76), ainda, o teste post-hoc demonstrou que os níveis de IL-6 do grupo controle apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grave, bem como a mediana do grupo grave foi diferente estatisticamente do grupo moderado ($p < 0,05$). O fator de necrose tumoral TNF-alfa também apresentou maior valor de mediana no grupo com COVID-19 grave (9,62 pg/mL; IC95% 3,84-50,36), ainda, no teste post-hoc, o grupo controle foi diferente estatisticamente do grupo com COVID-19 grave ($p < 0,05$). Dados apresentados na Tabela 02 e na Figura 01.

Em relação ao interferon IFN-alfa, a mediana também foi maior no grupo com a COVID-19 em estado grave (3,96 pg/mL; IC95% 1,10-11,46), apresentando diferença entre os grupos controle e com COVID-19 grave ($p < 0,05$) e entre os grupos com COVID-19 grave e moderado ($p < 0,05$). A interleucina IL-12p40 demonstrou maiores níveis no grupo com COVID-19 grave (85,41 pg/mL; IC95% 16,95-613,97), além disso, houve diferença entre os grupos controle com COVID-19 grave ($p < 0,05$) bem como nos grupos controle e grupo com COVID-19 em estado moderado ($p < 0,05$). O interferon IFN-Gama apresentou maior valor de mediana no grupo com COVID-19 grave (17,40 pg/mL; IC95% 1,19-58,84), tendo

apresentado pelo teste post-hoc diferença entre os grupos controle e COVID-19 grave ($p < 0,05$). O TNF-Beta não demonstrou significância estatística quando comparado pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$). Dados apresentados na Tabela 02 e na Figura 01.

A interleucina IL-18 apresentou maior valor de mediana no grupo com COVID-19 grave (17,005 pg/mL; IC95% 1,19-58,84), ainda, o teste post-hoc demonstrou que há diferença estatística entre os grupos controle e COVID-19 grave ($p < 0,05$). A interleucina IL-2R-alfa também apresentou maiores níveis no grupo com COVID-19 grave (56,25 pg/mL; IC95% 4,91-151,67), demonstrando diferença estatística entre os grupos controle e com COVID-19 grave ($p < 0,05$). Por fim, a interleucina IL-16 demonstrou maior valor de mediana também no grupo com COVID-19 (54,67 pg/mL; IC95% 2,95-283,99), com diferença entre os grupos controle e com COVID-19 grave ($p < 0,05$), bem como entre os grupos com COVID-19 grave e com COVID-19 moderada ($p < 0,05$). Dados apresentados na Tabela 02 e na Figura 01.

Para verificar o poder de predição das citocinas pró-inflamatórias em diferenciar os casos moderados dos graves, analisou-se as citocinas IL-6, IL-16 e IFN-Alfa2 que demonstraram diferença entre os grupos moderados e graves pelo teste post-hoc de Dunn. Assim, montou-se modelos de curva ROC para avaliar a área sob a curva. A IL-6 apresentou área sob a curva (AUC) de 0,727, com ponto de corte $> 0,93$ (sensibilidade de 91,4% e especificidade de 46,7%), a IL-16 AUC de 0,740, com ponto de corte $> 33,55$ (sensibilidade de 63,9% e especificidade de 75%) e o IFN-Alfa2 AUC de 0,727, com ponto de corte $> 3,06$ (sensibilidade de 72,2% e especificidade de 86,7%) demonstrando serem bons preditores de gravidade da COVID. Dados apresentados na Figura 02.

Discussão

Neste estudo foi observado que o perfil de citocinas de pacientes com COVID-19 moderada apresenta diferença do perfil de pacientes com COVID-19 grave, especialmente no que diz respeito a IL-6, IL-16 e IFN-Alfa-2. Na meta-análise realizada por Coomes e Haghbayan (2020)⁹ foi evidenciada que os níveis séricos de IL-6 se encontram significativamente elevados pacientes com a COVID-19 grave, sendo associados com desfechos de admissão em leito de unidade de terapia intensiva (UTI) e óbito.

Além disso, segundo esse estudo pacientes com COVID-19 grave apresentaram níveis séricos de IL-6 três vezes maiores do que os pacientes com a COVID-19 sem complicações.

Que e cols. (2022)¹⁰, Chen e cols. (2020)⁵ e Huang e cols. (2020)² também verificaram que IL-6 está relacionada com a gravidade da COVID-19, assim como com o desfecho óbito.

Os resultados desses estudos corroboram com os aqui apresentados, visto que a IL-6 apresentou maiores níveis séricos no grupo grave e se comportou como bom preditor de gravidade da doença (ponto de corte >0,93), podendo assim, ser utilizado para inferir a probabilidade de gravidade da doença, auxiliando no manejo clínico do paciente. A IL-6 possui um papel central na ativação e manutenção da resposta inflamatória e parece se correlacionar com a insuficiência respiratória (PaO₂ e SpO₂), uma vez que regula positivamente monócitos, MCP-1 e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), os quais contribuem para o aumento da permeabilidade vascular, injúria tecidual, hipotensão e insuficiência respiratória.¹⁰⁻¹³

Os interferons (IFNs) são moléculas chaves para a defesa antiviral e os do tipo 1, como o IFN-alfa, são importantes nos estágios iniciais das infecções virais, pois estão envolvidos com a inibição da replicação viral. Porém, estudos *in vitro* e *in vivo*^{14,15}; evidenciaram que o vírus SARCoV-2 é eficaz em evitar ou retardar o desencadeamento de respostas imunes inatas associadas a IFNs tipo I e III, levando assim a uma ineficiência da imunidade e falha no controle da infecção.

Nesse contexto, o presente trabalho reforça a possibilidade da ineficácia imune, uma vez que, demonstrou que o IFN-alfa é um potencial biomarcador de gravidade para COVID-19, reforçando a teoria de que a liberação retardada de IFNs na infecção pelo SARS-CoV-2 dificulta a resposta antiviral, colaborando com o aumento das citocinas e quimiocinas, recrutamento de células inflamatórias (p. ex.: neutrófilos e monócitos) e infiltração pulmonar característica da COVID-19 (YE et al., 2020). Hadjadj e cols. (2020)¹⁶ e Galani e cols. (2021)¹⁷ também afirmaram que respostas prejudicadas de IFN tipo I e III estão associadas a maior risco de gravidade da COVID-19.

A interleucina 16 (IL-16) também demonstrou bom poder de predição para diferenciar casos moderados dos casos graves, com AUC de 0,740 (ponto de corte > 33,55). No estudo de Luellen (2020)¹ a IL-16 classificou com precisão casos sintomáticos com ponto de corte >44,59 em 90,4% dos casos corroborando com os dados aqui apresentados. Dessa maneira, observa-se que pacientes com a COVID-19 grave possuem uma resposta imunológica mais robusta ou exacerbada ao SARS-CoV-2 culminando na liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-16, que juntamente com a IL-6 pode ser utilizada na diferenciação de casos leves, moderados e graves da COVID-19.

Dessa forma, de acordo com Zanza e cols. (2022)³ na primeira fase da infecção o sistema imune inato não consegue agir adequadamente na remoção do vírus das células infectadas podendo até mesmo favorecer a replicação viral, bem como favorecer a replicação do SARS-CoV-2 dentro dos macrófagos. Assim, somente na segunda fase da infecção o sistema imunológico poderia combater o vírus de forma eficaz, porém, nessa fase o SARS-CoV-2 encontra-se com uma carga viral alta ao ponto de induzir uma resposta imunológica exacerbada como a tempestade de citocinas.

É válido salientar que o presente é uma análise de não seguimento, com um número limitado de participantes; porém, foi realizado com pessoas não vacinadas, excluindo assim, o viés de alteração da resposta imune devido ao reforço vacinal. Além do mais, a determinação de biomarcadores preditores de gravidade é de fundamental importância para o monitoramento dos pacientes, auxílio em decisões terapêuticas e gerenciamento de recursos em saúde. Ainda, estudos anteriores exploraram o valor preditivo da IL-6 com diferentes aspectos clínicos da COVID-19, mas outros biomarcadores ainda precisam ser avaliados frente a predição de gravidade, bem como a sua participação na tempestade de citocinas e viabilidade de implantação na rotina laboratorial e diagnóstica.

Conclusão

Este estudo pode verificar o perfil de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com a COVID-19, demonstrando que a IL-6, IL-16 e IFN-Alfa2 possuem poder de predição em diferenciar os casos moderados dos casos graves, podendo auxiliar no manejo clínico do paciente. Ainda, reiteramos que mais estudos precisam ser realizados a fim de verificar a viabilidade de avaliar essas citocinas na prática clínica e laboratorial.

Referências

- 1- Luellen E. (2020). A Machine Learning Explanation of the Pathogen-Immune Relationship of SARS-CoV-2 (COVID-19), and a Model to Predict Immunity and Therapeutic Opportunity: A Comparative Effectiveness Research Study. *JMIRx med*, 1(1), e23582. <https://doi.org/10.2196/23582>
- 2- Huang, Chaolin et al. "Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China." *Lancet (London, England)* vol. 395,10223 (2020): 497-506. doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5
- 3- Zanza, C., Romenskaya, T., Manetti, A. C., Franceschi, F., La Russa, R., Bertozzi, G., Maiese, A., Savioli, G., Volonnino, G., & Longhitano, Y. (2022). Cytokine Storm in COVID-

- 19: Immunopathogenesis and Therapy. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 58(2), 144.
<https://doi.org/10.3390/medicina58020144>
- 4- Ye, Q., Wang, B., & Mao, J. (2020). The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. *The Journal of infection*, 80(6), 607–613.
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.037>
- 5- Chen, G., Wu, D., Guo, W., Cao, Y., Huang, D., Wang, H., Wang, T., Zhang, X., Chen, H., Yu, H., Zhang, X., Zhang, M., Wu, S., Song, J., Chen, T., Han, M., Li, S., Luo, X., Zhao, J., & Ning, Q. (2020). Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *The Journal of clinical investigation*, 130(5), 2620–2629.
<https://doi.org/10.1172/JCI137244>
- 6- Nigar, S., Shah, S. T., Setu, M., Dip, S. D., Ibrat, H., Islam, M. T., Akter, S., Jahid, I. K., & Hossain, M. A. (2021). Relative expression of proinflammatory molecules in COVID-19 patients who manifested disease severities. *Journal of medical virology*, 93(10), 5805–5815.
<https://doi.org/10.1002/jmv.27112>
- 7- Jing, X., Xu, M., Song, D., Yue, T., Wang, Y., Zhang, P., Zhong, Y., Zhang, M., Lam, T. T., Faria, N. R., De Clercq, E., & Li, G. (2022). Association between inflammatory cytokines and anti-SARS-CoV-2 antibodies in hospitalized patients with COVID-19. *Immunity & ageing : I & A*, 19(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12979-022-00271-2>
- 8- Wang, J., Li, Q., Yin, Y., Zhang, Y., Cao, Y., Lin, X., Huang, L., Hoffmann, D., Lu, M., & Qiu, Y. (2020). Excessive Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19. *Frontiers in immunology*, 11, 2063. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02063>
- 9- Coomes, E. A., & Haghighyan, H. (2020). Interleukin-6 in Covid-19: A systematic review and meta-analysis. *Reviews in medical virology*, 30(6), 1–9. <https://doi.org/10.1002/rmv.2141>
- 10- Que, Y., Hu, C., Wan, K., Hu, P., Wang, R., Luo, J., Li, T., Ping, R., Hu, Q., Sun, Y., Wu, X., Tu, L., Du, Y., Chang, C., & Xu, G. (2022). Cytokine release syndrome in COVID-19: a major mechanism of morbidity and mortality. *International reviews of immunology*, 41(2), 217–230. <https://doi.org/10.1080/08830185.2021.1884248>
- 11- Hurst, S. M., Wilkinson, T. S., McLoughlin, R. M., Jones, S., Horiuchi, S., Yamamoto, N., Rose-John, S., Fuller, G. M., Topley, N., & Jones, S. A. (2001). Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity*, 14(6), 705–714. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(01\)00151-0](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00151-0)
- 12- Jenkins, B. J., Grail, D., Inglese, M., Quilici, C., Bozinovski, S., Wong, P., & Ernst, M. (2004). Imbalanced gp130-dependent signaling in macrophages alters macrophage colony-stimulating factor responsiveness via regulation of c-fms expression. *Molecular and cellular biology*, 24(4), 1453–1463. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.4.1453-1463.2004>

- 13- Kang, S., Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2019). Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. *Immunity*, 50(4), 1007–1023. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.026>

- 14- Arunachalam, P. S., Wimmers, F., Mok, C., Perera, R., Scott, M., Hagan, T., Sigal, N., Feng, Y., Bristow, L., Tak-Yin Tsang, O., Wagh, D., Collier, J., Pellegrini, K. L., Kazmin, D., Alaaeddine, G., Leung, W. S., Chan, J., Chik, T., Choi, C., Huerta, C., ... Pulendran, B. (2020). Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6508), 1210–1220. <https://doi.org/10.1126/science.abc6261>

- 15- Bastard, P., Rosen, L. B., Zhang, Q., Michailidis, E., Hoffmann, H. H., Zhang, Y., Dorgham, K., Philippot, Q., Rosain, J., Béziat, V., Manry, J., Shaw, E., Haljasmägi, L., Peterson, P., Lorenzo, L., Bizien, L., Trouillet-Assant, S., Dobbs, K., de Jesus, A. A., Belot, A., ... Casanova, J. L. (2020). Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science (New York, N.Y.)*, 370(6515), eabd4585. <https://doi.org/10.1126/science.abd4585>

- 16- Hadjadj, J., Yatim, N., Barnabei, L., Corneau, A., Boussier, J., Smith, N., Péré, H., Charbit, B., Bondet, V., Chenevier-Gobeaux, C., Breillat, P., Carlier, N., Gauzit, R., Morbieu, C., Pène, F., Marin, N., Roche, N., Szwebel, T. A., Merklings, S. H., Treluyer, J. M., ... Terrier, B. (2020). Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6504), 718–724. <https://doi.org/10.1126/science.abc6027>

- 17- Galani, I. E., Rovina, N., Lampropoulou, V., Triantafyllia, V., Manioudaki, M., Pavlos, E., Koukaki, E., Fragkou, P. C., Panou, V., Rapti, V., Koltsida, O., Mentis, A., Koulouris, N., Tsiodras, S., Koutsoukou, A., & Andreakos, E. (2021). Untuned antiviral immunity in COVID-19 revealed by temporal type I/III interferon patterns and flu comparison. *Nature immunology*, 22(1), 32–40. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00840-x>

Tabela 01. Dados sociodemográficos de pacientes com COVID-19, em fase aguda da infecção, internados no Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão. Região da Amazônia Legal, Brasil, 2020.

	Total (51)	Moderado (15)	Grave (36)	p-valor
Variáveis	N (%)	N (%)	N (%)	
Sexo				
Feminino	20 (39,2)	6 (40)	14 (38,9)	0,9
Masculino	31 (60,8)	9 (60)	22 (61,1)	
Óbito				
Não	42 (82,4)	16 (93,3)	28 (77,8)	0,1
Sim	9 (17,6)	1 (6,7)	8 (22,2)	
Estado Civil				
Solteiro/Separado/Viúvo	11 (21,6)	0 (0)	11 (30,6)	0,01
Casado/União Estável	40 (78,4)	15 (100)	25 (69,4)	
Cor da pele				
Branca	16 (31,4)	1 (6,7)	15 (41,7)	0,01
Preto/Pardo	35 (68,6)	15 (93,3)	21 (58,3)	
Escolaridade				
Analfabeto	36 (70,6)	11 (73,3)	25 (69,4)	0,9
1º Grau	3 (5,9)	1 (6,7)	2 (5,9)	
completo/incompleto	11 (21,6)	3 (20)	8 (22,2)	
2º Grau	1 (2,0)	0 (0)	1 (2,8)	
completo/incompleto				
Superior				
completo/incompleto				

Dados apresentados em formato de proporção e analisados pelo teste do qui-quadrado. Considerou-se um p valor significativo de 0,05.

Tabela 02. Perfil de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com COVID-19, em fase aguda da infecção, internados no Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão. Região da Amazônia Legal, Brasil, 2020.

	Controle (33)	Moderado (15)	Grave (36)	p-valor
IL-6 (pg/mL)				
Mediana (IC95%)	0,90 (0,09-20,9)	0,93 (0,1-30,4)	3,1 (0,31-81,76)	0,0006
TNF-Alfa (pg/mL)				
Mediana (IC95%)	4,1 (2,2-22,6)	4,00 (0,69-43,38)	9,6 (3,84-50,36)	< 0,0001
IFN-Alfa (pg/mL)				
Mediana (IC95%)	2,6 (1,1-21,1)	2,4 (1,45-12,84)	3,9 (1,1-11,4)	0,0068
IL-12p40 (pg/mL)				
Mediana (IC95%)	36,32 (14,3-187)	55,7 (16,9-281,3)	85,4 (16,9-613,6)	0,0002
IFN-Gama (pg/mL)				
Mediana (IC95%)	7,9 (2,7-27,8)	13,1 (4,1-39,2)	17,4 (1,1-58,8)	< 0,0001
TNF-Beta (pg/mL)				
Mediana (IC95%)	8,6 (5,3-929,5)	10,3 (4,5-53,1)	10,2 (4,8-69,7)	0,4279
IL-18 (pg/mL)				
Mediana (IC95%)	6,1 (1,0-39,1)	7,5 (3,4-49,0)	17 (1,1-58,8)	0,0022
IL-2R alfa (ng/mL)				
Mediana (IC95%)	38,19 (11,1-113)	43,6 (30,3-76,1)	56,2 (4,9-151,6)	0,0049
IL-16 (pg/mL)				
Mediana (IC95%)	21,41 (0,3-185)	16,5 (0,05-228)	54,6 (2,95-283,9)	0,0003

Dados apresentados em formato de mediana e IC95%, analisados Kruskal-Wallis para mais de três grupos e post-hoc de Dunn. Considerou-se um p valor significativo de 0,05.

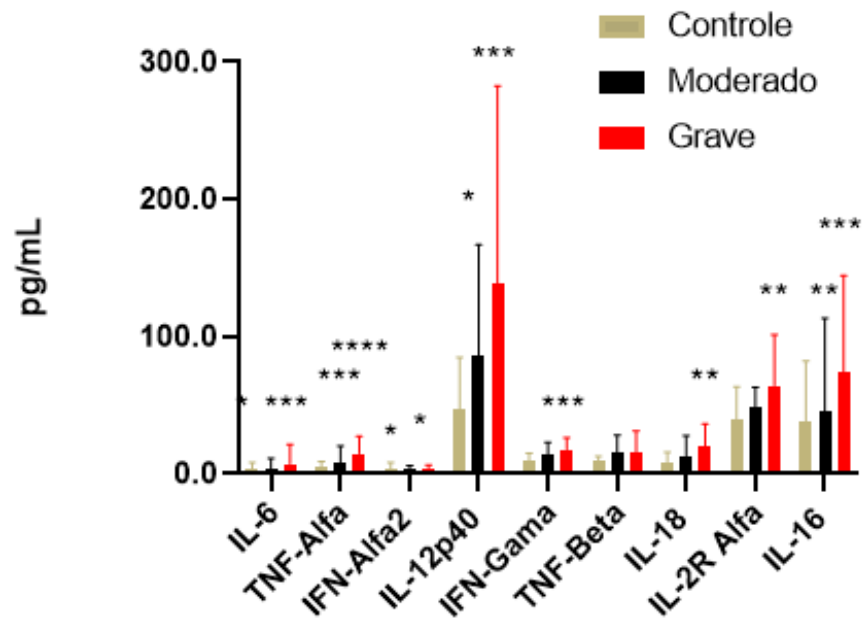


Figura 01. Comparação entre as concentrações de citocinas pró-inflamatórias entre os grupos Controle, Moderado e Grave. * Valor de p significativo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Dados analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn.

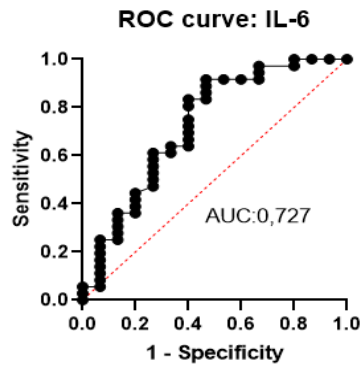
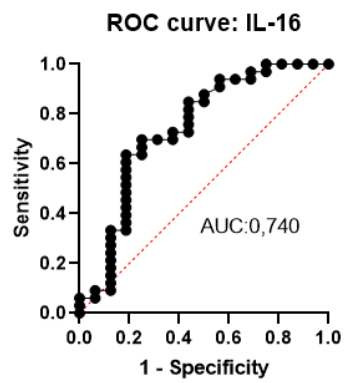
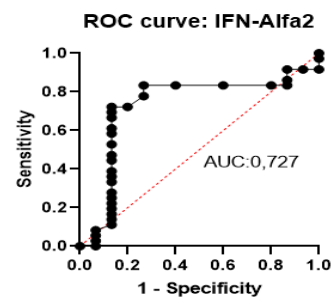
A**B****C**

Figura 02. Modelo de Curva ROC de predição de casos de COVID-19 grave. (A) Para a Interleucina IL-6 (B) Para a interleucina IL-16 (C) Para o Interferon IFN-Alfa2 (IFN-Alfa2).

5 CONCLUSÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta pesquisa demonstrou que o uso de parâmetros hematológicos como a contagem de leucócitos e neutrófilos e de marcadores inflamatórios como a proteína C reativa e a relação neutrófilo-linfócito podem definir o prognóstico da severidade da COVID-19. Além disso, esse estudo também pode verificar que citocinas como a IL-6, IL-16 e IFN- α 2 possuem poder de predição em diferenciar os casos moderados dos casos graves, podendo auxiliar no manejo clínico do paciente. Ainda, reiteramos que mais estudos precisam ser realizados com a finalidade de avaliar a eficiência do uso de biomarcadores inflamatórios, hematológicos e citocinas para manejo do paciente com COVID-19.

6 REFERÊNCIAS DA DISSERTAÇÃO

ALI, Fares EM *et al.* Impact of cytokine storm and systemic inflammation on liver impairment patients infected by SARS-CoV-2: Prospective therapeutic challenges. **World Journal of Gastroenterology**, v. 27, n. 15, p. 1531, 2021.

ALI, Nurshad. Elevated level of C-reactive protein may be an early marker to predict risk for severity of COVID-19. **Journal of medical virology**, 2020.

AL-ZAIDAN, Lobna *et al.* The expression of hACE2 receptor protein and its involvement in SARS-CoV-2 entry, pathogenesis, and its application as potential therapeutic target. **Tumor Biology**, v. 43, n. 1, p. 177-196, 2021.

ARUNACHALAM, Prabhu 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, 2020.

ARYAL, Madan Raj *et al.* Venous thromboembolism in COVID-19: towards an ideal approach to thromboprophylaxis, screening, and treatment. **Current cardiology reports**, v. 22, n. 7, p. 1-5, 2020.

ASSELAH, Tarik *et al.* COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development. **Journal of hepatology**, v. 74, n. 1, p. 168-184, 2021.

BADEN, Lindsey R. *et al.* Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. **New England journal of medicine**, 2020.

BASBUS, Luis *et al.* Índice neutrófilo-linfócito como factor pronóstico de COVID-19. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 80, p. 31-36, 2020.

BASTARD, P. *et al.* HGID Lab. NIAID-USUHS Immune Response to COVID Group. COVID Clinicians. COVID-STORM Clinicians. Imagine COVID Group. French COVID Cohort Study Group. Milieu Intérieur Consortium. CoV-Contact Cohort. Amsterdam UMC Covid-19 Biobank. COVID Human Genetic Effort Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. **Science**, v. 370, n. 6515, p. eabd4585, 2020.

BEYERSTEDT, Stephany; CASARO, Expedito Barbosa; RANGEL, Érika Bevilaqua. COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 40, n. 5, p. 905-919, 2021.

BRASIL. Coronavírus. **Painel de Coronavírus**. Disponível em: < <https://covid.saude.gov.br/> >. Acesso em: 05 de maio. de 2021.

CAVALCANTE, João Roberto et al. COVID-19 no Brasil: evolução da epidemia até a semana epidemiológica 20 de 2020. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 29, 2020.

CAVALCANTE-SILVA, Luiz Henrique Agra *et al.* Neutrophils and COVID-19: The road so far. **International immunopharmacology**, v. 90, p. 107233, 2021.

CEKEREVAC, Ivan *et al.* Predicting severity and intrahospital mortality in COVID-19: the place and role of oxidative stress. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2021, 2021.

CHEN, Guang *et al.* Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. **The Journal of clinical investigation**, v. 130, n. 5, p. 2620-2629, 2020.

CHOWDHURY, Abu Taiub Mohammed Mohiuddin *et al.* Analysis of the primary presenting symptoms and hematological findings of COVID-19 patients in Bangladesh. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 15, n. 02, p. 214-223, 2021.

COOMES, Eric A.; HAGHBAYAN, Hourmazd. Interleukin-6 in COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **Reviews in medical virology**, v. 30, n. 6, p. 1-9, 2020.

COOPER, Samantha L. *et al.* Role of the renin–angiotensin–aldosterone and kinin–kallikrein systems in the cardiovascular complications of COVID-19 and long COVID. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 15, p. 8255, 2021.

CRUVINEL, Wilson de Melo *et al.* Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 434-447, 2010.

DA SILVA, Renan Pereira et al. Cenário epidemiológico da COVID-19 no nordeste do Brasil. **Saúde Coletiva (Barueri)**, v. 10, n. 59, p. 4420-4429, 2020.

FILCHAKOVA, Olena *et al.* Review of COVID-19 testing and diagnostic methods. **Talanta**, p. 123409, 2022.

FU, Jianhong *et al.* The clinical implication of dynamic neutrophil to lymphocyte ratio and D-dimer in COVID-19: A retrospective study in Suzhou China. **Thrombosis research**, v. 192, p. 3-8, 2020.

GALANI, Ioanna-Evdokia et al. Untuned antiviral immunity in COVID-19 revealed by temporal type I/III interferon patterns and flu comparison. **Nature immunology**, v. 22, n. 1, p. 32-40, 2021.

GALVÃO, Maria Helena Rodrigues; RONCALLI, Angelo Giuseppe. Fatores associados a maior risco de ocorrência de óbito por COVID-19: análise de sobrevivência com base em casos confirmados. **Revista brasileira de epidemiologia**, v. 23, 2021.

GEBHARD, Catherine *et al.* Impact of sex and gender on COVID-19 outcomes in Europe. **Biology of sex differences**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2020.

GUAN, Yanjun; DENG, Hong; ZHOU, Xinyi. Understanding the impact of the COVID-19 pandemic on career development: Insights from cultural psychology. **Journal of vocational behavior**, v. 119, p. 103438, 2020.

GUSTINE, Joshua N.; JONES, Dennis. Immunopathology of Hyperinflammation in COVID-19. **The American journal of pathology**, v. 191, n. 1, p. 4-17, 2021.

HADJADJ, Jérôme *et al.* Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. **Science**, v. 369, n. 6504, p. 718-724, 2020.

HARISHA, E. J. *et al.* Liver: Function and dysfunction in COVID-19. **Journal of Family Medicine and Primary Care**, v. 11, n. 2, p. 758, 2022.

HARTENIAN, Ella *et al.* The molecular virology of coronaviruses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 37, p. 12910-12934, 2020.

HE, Feng; DENG, Yu; LI, Weina. Coronavirus disease 2019: What we know?. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 7, p. 719-725, 2020.

HOSSEINI, Elahe Seyed *et al.* The novel coronavirus Disease-2019 (COVID-19): Mechanism of action, detection and recent therapeutic strategies. **Virology**, v. 551, p. 1-9, 2020.

HU, Biying; HUANG, Shaoying; YIN, Lianghong. The cytokine storm and COVID-19. **Journal of medical virology**, v. 93, n. 1, p. 250-256, 2021.

HUANG, Chaolin *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497-506, 2020.

HURST, Suzanne M. *et al.* Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. **Immunity**, v. 14, n. 6, p. 705-714, 2001.

JACKSON, Cody B. *et al.* Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 3-20, 2022.

JENKINS, Brendan J. *et al.* Imbalanced gp130-dependent signaling in macrophages alters macrophage colony-stimulating factor responsiveness via regulation of c-fms expression. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 4, p. 1453-1463, 2004.

- JING, Xixi et al. Association between inflammatory cytokines and anti-SARS-CoV-2 antibodies in hospitalized patients with COVID-19. **Immunity & Ageing**, v. 19, n. 1, p. 1-17, 2022.
- KANG, Sujin et al. Targeting interleukin-6 signaling in clinic. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 1007-1023, 2019.
- KIM, Jae Seok *et al.* Immunopathogenesis and treatment of cytokine storm in COVID-19. **Theranostics**, v. 11, n. 1, p. 316, 2021.
- KIRTIPAL, Nikhil; BHARADWAJ, Shiv; KANG, Sang Gu. 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, 2020.
- KOPEL, Jonathan *et al.* Racial and gender-based differences in COVID-19. **Frontiers in public health**, v. 8, p. 418, 2020.
- LAI, Chih-Cheng et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. **International journal of antimicrobial agents**, v. 55, n. 3, p. 105924, 2020.
- LEE, Jeong Seok; SHIN, Eui-Cheol. The type I interferon response in COVID-19: implications for treatment. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 10, p. 585-586, 2020.
- LEISMAN, Daniel E.; DEUTSCHMAN, Clifford S.; LEGRAND, Matthieu. Facing COVID-19 in the ICU: vascular dysfunction, thrombosis, and dysregulated inflammation. **Intensive Care Medicine**, v. 46, n. 6, p. 1105-1108, 2020.
- LI, Yanwei *et al.* Physiological and pathological regulation of ACE2, the SARS-CoV-2 receptor. **Pharmacological research**, v. 157, p. 104833, 2020.
- LIPPI, Giuseppe; PLEBANI, Mario. Procalcitonin in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 505, p. 190, 2020.
- LIU, Gaoli *et al.* The role of neutrophil-lymphocyte ratio and lymphocyte–monocyte ratio in the prognosis of type 2 diabetics with COVID-19. **Scottish Medical Journal**, v. 65, n. 4, p. 154-160, 2020.
- LIU, Jing et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. **EBioMedicine**, v. 55, p. 102763, 2020.
- LONG, Quan-Xin et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. **Nature medicine**, v. 26, n. 6, p. 845-848, 2020.
- LUELLEN, Eric. A Machine Learning Explanation of the Pathogen-Immune Relationship of SARS-CoV-2 (COVID-19), and a Model to Predict Immunity and Therapeutic Opportunity: A Comparative Effectiveness Research Study. *Jmirx med*, v.1, n.1, p.e23582, 2020.

LUO, Xiaomin *et al.* Prognostic value of C-reactive protein in patients with coronavirus 2019. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 16, p. 2174-2179, 2020.

MCGONAGLE, Dennis *et al.* The role of cytokines including interleukin-6 in COVID-19 induced pneumonia and macrophage activation syndrome-like disease. **Autoimmunity reviews**, v. 19, n. 6, p. 102537, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. BRASIL. **Diretrizes para Diagnóstico e Tratamento da COVID-19**. 2022.

NIGAR, Shireen *et al.* Relative expression of proinflammatory molecules in COVID-19 patients who manifested disease severities. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 10, p. 5805-5815, 2021.

PACES, Jan *et al.* COVID-19 and the immune system. **Physiological research**, v. 69, n. 3, p. 379, 2020.

PATHANGEY, Girish *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 and COVID-19: patients, comorbidities, and therapies. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 320, n. 3, p. L301-L330, 2021.

PONS, Stéphanie *et al.* The vascular endothelium: the cornerstone of organ dysfunction in severe SARS-CoV-2 infection. **Critical care**, v. 24, n. 1, p. 1-8, 2020.

PONTI, Giovanni *et al.* Biomarkers associated with COVID-19 disease progression. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 57, n. 6, p. 389-399, 2020.

QUE, Yifan *et al.* Cytokine release syndrome in COVID-19: a major mechanism of morbidity and mortality. **International reviews of immunology**, v. 41, n. 2, p. 217-230, 2022.

RAHI, Mandeep Singh *et al.* Hematologic disorders associated with COVID-19: a review. **Annals of hematology**, v. 100, n. 2, p. 309-320, 2021.

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

RUAN, Qiurong *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**, v. 46, n. 5, p. 846-848, 2020.

SAMUEL, Ryan M. *et al.* Androgen signaling regulates SARS-CoV-2 receptor levels and is associated with severe COVID-19 symptoms in men. **Cell Stem Cell**, v. 27, n. 6, p. 876-889. e12, 2020.

SHARMA, Homa Nath; LATIMORE, Charity OD; MATTHEWS, Qiana L. Biology and pathogenesis of SARS-CoV-2: understandings for therapeutic developments against COVID-19. **Pathogens**, v. 10, n. 9, p. 1218, 2021.

SHUKLA, Ashwin Kumar; BANERJEE, Monisha. Angiotensin-converting-enzyme 2 and

renin-angiotensin system inhibitors in COVID-19: an update. **High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention**, p. 1-11, 2021.

SIFUENTES-RODRÍGUEZ, Erika; PALACIOS-REYES, Deborah. COVID-19: The outbreak caused by a new coronavirus. **Boletín Medico del Hospital Infantil de Mexico**, v. 77, n. 2, p. 47-53, 2020.

SOBHANI, Sahar *et al.* Association between clinical characteristics and laboratory findings with outcome of hospitalized COVID-19 patients: a report from Northeast Iran. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2021, 2021.

SSENTONGO, Paddy *et al.* Association of cardiovascular disease and 10 other pre-existing comorbidities with COVID-19 mortality: a systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 15, n. 8, p. e0238215, 2020.

SUNDARAM, Maria E. *et al.* Individual and social determinants of SARS-CoV-2 testing and positivity in Ontario, Canada: a population-wide study. **Cmaj**, v. 193, n. 20, p. E723-E734, 2021.

TAN, Anthony T. *et al.* Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. **Cell reports**, v. 34, n. 6, p. 108728, 2021.

VABRET, Nicolas *et al.* Immunology of COVID-19: current state of the science. **Immunity**, 2020.

WANG, Guyi *et al.* C-reactive protein level may predict the risk of COVID-19 aggravation. In: **Open forum infectious diseases**. US: Oxford University Press, 2020. p. ofaa153.

WANG, Jun *et al.* Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps in COVID-19. **Frontiers in immunology**, p. 2063, 2020.

XAVIER, Analucia R. *et al.* COVID-19: manifestações clínicas e laboratoriais na infecção pelo novo coronavírus. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 56, 2020.

XU, Zhe *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.

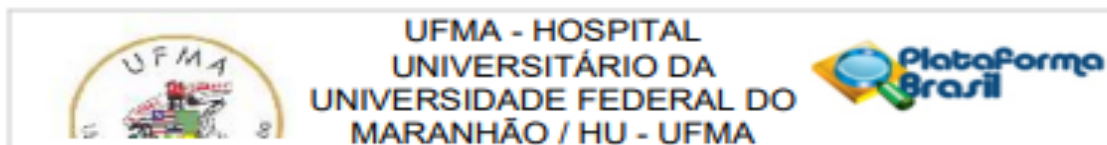
YANG, Chu-Wen; CHEN, Mei-Fang. Composition of human-specific slow codons and slow di-codons in SARS-CoV and 2019-nCoV are lower than other coronaviruses suggesting a faster protein synthesis rate of SARS-CoV and 2019-nCoV. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 53, n. 3, p. 419-424, 2020.

YE, Qing; WANG, Bili; MAO, Jianhua. The pathogenesis and treatment of the Cytokine Storm in COVID-19. **Journal of infection**, v. 80, n. 6, p. 607-613, 2020.

ZANZA, Christian *et al.* Cytokine Storm in COVID-19: Immunopathogenesis and Therapy. **Medicina**, v. 58, n. 2, p. 144, 2022.

ZHOU, Fei et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **The lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1054-1062, 2020.

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE MEDIADORES IMUNOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS CIRCULANTES EM PACIENTES COM COVID-19

Pesquisador: SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 32226420.9.0000.5086

Instituição Proponente: Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão/HU/UFMA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.157.769

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_1561812. Datado de 10/07/20).

1.INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, uma série de casos de "pneumonia" de origem desconhecida foi relatada em Wuhan, China. As autoridades sanitárias chinesas tomaram medidas de saúde pública, incluindo vigilância e investigações epidemiológicas, e confirmaram o agente causador como pertencente à família coronavírus (HUI et al., 2020). A Organização Mundial da Saúde nomeou a doença como coronavírus 2019 (COVID-19) e em 11 de março de 2020, considerou esta infecção uma pandemia (BEECHING et al., 2020; WHO 2020). A doença se espalhou rapidamente pelo território chinês e em outros países, principalmente na Europa (tendo como epicentros a Itália e a Espanha), nos Estados Unidos, no Canadá e no Brasil (BEECHING et al., 2020; WHO 2020). Segundo o relatório situacional do Ministério da Saúde de 21 de abril de 2020, no Brasil existem 291.579 casos acumulados e 8.859 óbitos (dados de 20/05/2020 - <https://covid.saude.gov.br/>) pela doença, tendo o estado de São Paulo como epicentro. A pandemia por SARS-COV-2 (agente infeccioso do COVID-19) tem como principais sintomas febre, fadiga e tosse seca, podendo evoluir

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

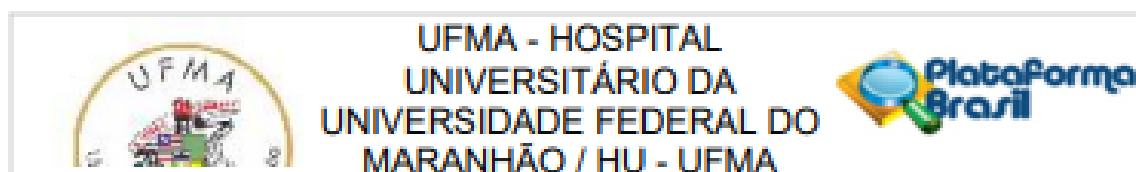
Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA **Município:** SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: csp@huufma.br



Continuação do Parecer: 4.157.768

para dispneia ou, em casos mais graves, para insuficiência respiratória aguda e insuficiência de múltiplos sistemas orgânicos, como renal, hepático e cardiovascular (CHEN, et al., 2020; TOTURA, BARIC, 2012). De acordo com Guan e cols. (2020) os pacientes admitidos em unidades hospitalares com SARS-CoV-2 apresentaram linfocitopenia (83,2%), trombocitopenia (36,2%) e leucopenia (33,7%), além de níveis elevados de proteína C reativa. Alguns estudos mostraram que a presença de comorbidades como diabetes mellitus, hipertensão arterial, obesidade e doença coronariana estão relacionados ao maior risco de morte por COVID-19 (WU et al., 2020; ZHOU et al., 2020). Além disso, idade avançada, linfopenia, leucocitose e elevados níveis séricos de alanina aminotransferase, lactato desidrogenase, troponina de alta sensibilidade, creatina quinase, D-dímero, ferritina sérica, IL-6, creatinina sérica, pro-calcitonina e tempo de protrombina também foram preditores para morte (WU et al., 2020). O agravamento do quadro clínico também esteve relacionado ao aumento de citocinas inflamatórias, incluindo IL2, IL7, IL10, GCSF, IP10, MCP1, MIP1A e TNF (CHEN et al., 2020). Evidências científicas ainda sugerem que um grupo de pacientes com casos graves da doença podem desenvolver uma síndrome de super ativação imunológica sistêmica descrita como uma "tempestade de citocinas" (hipercitocinemia) ou síndrome hiperinflamatória que piora o quadro pulmonar e pode levar à falência múltipla de órgãos (YANG et al., 2020; WANG, JIANG, SONG, 2020; WU et al., 2020). Os escassos dados disponíveis indicam que esta hiperativação imunológica leva à produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias causando citopenias, hiperferritinemia, elevação de lactato desidrogenase, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, fator de necrose tumoral alfa, fator estimulador de colônias de granulócitos, D-dímero e proteína C reativa e quadro clínico mais grave (HUANG, et al., 2020; MEHTA, et al., 2020). No entanto, muitas perguntas sobre o novo coronavírus permanecem. Atualmente há informações limitadas acerca dessa infecção e dados ausentes em relação à faixa etária, fonte animal do vírus, período de incubação, curva epidêmica, cinética viral, via de transmissão, patogênese, manifestações clínicas, achados de autópsia, entre outros. Associado a isso, tem-se inúmeras incertezas em relação ao tratamento da doença em si e das complicações que surgem no curso da mesma; bem como a gravidade da inflamação em resposta ao vírus. Por se tratar de uma doença com graves consequências sociais e econômicas, com importante impacto na vida de milhares de famílias e reflexos consideráveis no futuro, a comunidade científica mundial vêm unindo esforços para o maior entendimento da infecção pelo vírus SARS-CoV-2 na busca de meios para minimizar os seus efeitos. No entanto, estudos com relação às manifestações clínicas induzidas pelo vírus são escassos, principalmente sobre a resposta inflamatória na infecção viral, elemento fundamental na determinação do grau de morbidade induzido pela doença. Neste contexto, é de grande

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

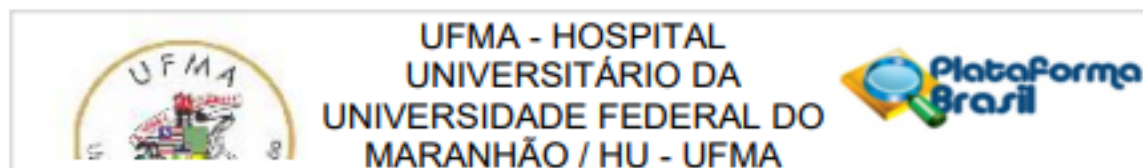
CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SÃO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: osp@huufma.br



Continuação do Parecer: 4.157.769

Importância avaliar parâmetros virológicos, imunológicos e bioquímicos e associá-los às formas clínicas da doença para maior compreensão da sua patogênese e o desenvolvimento de medidas de prognóstico que contribuam para um manejo clínico e tratamento da infecção mais adequados e eficazes. A partir da identificação dos biomarcadores preditivos de diagnóstico, eles poderão ser empregados para acompanhando dos pacientes, o que potencialmente implicar no aumento significativo de desfechos mais favoráveis para o paciente. O impacto social e epidemiológico virá da melhoria dos indicadores de saúde dos pacientes infectados pelo vírus atendidos pelos hospitais e pela diminuição da taxa de mortalidade.

Hipótese: A caracterização do perfil de mediadores imunológicos e bioquímicos circulantes em pacientes com COVID-19 contribuirá para o acompanhamento clínico-laboratorial dos pacientes e melhor desfecho em saúde.

2.METODOLOGIA PROPOSTA

- Tipo e local do estudo: Trata-se de uma pesquisa translacional, retrospectiva e prospectiva, exploratória a ser realizada com pessoas adultos, residentes no Estado do Maranhão com a infecção com SARS-COV-2, na fase aguda e de convalescente da infecção. Serão arrolados para este estudo pessoas que procurarem a realização do teste de confirmação para COVID-19 em laboratório de análises clínicas da rede privada (participantes ambulatoriais) e pacientes que se encontrarem internados no Hospital Universitário Presidente Dutra da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA) para tratamento da infecção pelo SARS-COV-2 (participantes hospitalares).

- Participantes: Os participantes desta pesquisa serão adultos (18 a 80 anos), moradores no Estado do Maranhão, de ambos os sexos, sem distinção de etnia e classe social, que procuraram o serviço de saúde da Rede Privada e Pública para a investigação/confirmação e tratamento da infecção pelo SARS-COV-2, respectivamente. A amostragem será por conveniência, com expectativa de alcançar, no mínimo 120 participantes.

- Coleta de Dados e Amostras Biológicas: As pessoas serão convidadas a participar do estudo, com explanação dos seus objetivos e procedimentos a serem realizados. Os participantes ambulatoriais (oriundos de laboratório de análises clínicas privados) serão abordados na recepção do laboratório de análises clínicas e os participantes hospitalares (HUUFMA) serão abordados no leito hospitalar juntamente com a Equipe de Enfermagem e/ou do Laboratório do HUUFMA. Todos assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – ANEXO 1). No que se refere aos participantes ambulatoriais, de cada um, será coletada amostra única de sangue periférico para processamento de marcadores imunológicos e bioquímicos; bem como a coleta de dados sociodemográficos, saúde (idade, sexo, histórico de doenças e/ou comorbidades, sintomas, entre outros – ANEXO 2) e

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

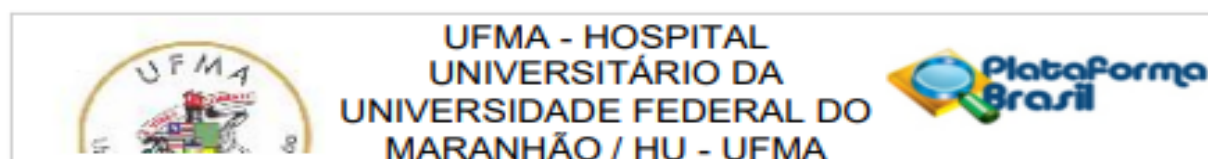
UF: MA

Telefone: (98)2109-1250

Município: SAO LUIS

CEP: 65.020-070

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 4.157.789

resultado de exames laboratoriais realizados no mesmo dia da testagem para COVID-19. Para os participantes hospitalares serão coletados dados de prontuário e amostras de sangue periférico seriados para o acompanhamento da evolução do quadro clínico laboratorial dos mesmos. As coletas serão tempo zero (T0 - quando da entrada no hospital e/ou após assinatura do TCLE), tempo 06 (T6 - após seis dias de internação e/ou após assinatura do TCLE) e tempo 08 (T8 - após oito dias de internação e/ou após assinatura do TCLE) ou na alta hospitalar, se essa ocorrer antes do T8. Os participantes hospitalares serão questionados (no momento de aplicação do TCLE) quanto ao desejo de serem acompanhados (fase de convalescência e de acompanhamento) para verificar possíveis alterações clínico laboratoriais devido a infecção com SARS-CoV-2. Esse acompanhamento prevê coleta de material biológico e dados de saúde em intervalos de tempo pré-determinados, porém, não é uma etapa obrigatória. As coletas de acompanhamento ocorreram entre 20 a 60 dias (01 coleta) após alta hospitalar (fase de convalescência) e entre 06 a 12 meses (01 coleta) também após alta hospitalar (fase de acompanhamento). As amostras de sangue periférico, para obtenção do soro e plasma, dos participantes com diagnóstico laboratorial e/ou clínico da COVID-19 serão coletadas pela equipe da Pesquisa e posteriormente encaminhadas para o Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Presidente Dutra, para o Bando de Tumor e DNA do Maranhão (BTMA) e para o Instituto René Rachou (IRR)-FIOCURZ/MG para devida identificação (codificação), separação e processamento das análises laboratoriais.

- Análises Laboratoriais: As análises laboratoriais realizadas serão hemograma completo, marcadores bioquímicos (Ferritina sérica, D-dímero, troponina ultra sensível, pró-calcitonina, peptídeo natriurético) e mediadores inflamatórios (proteína C reativa, interleucina 6, fator de necrose tumoral, entre outros). O hemograma completo e os parâmetros bioquímicos serão realizados no Laboratório de Análises Clínicas.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados será realizada pelo SPSS, STATA, Medcalc e os gráficos no GraphPad Prism 8. Serão feitas análise de variáveis independentes e dependentes, uni- e multivariadas, Abordagens específicas para identificação de biomarcadores serão empregadas, utilizando ferramentas de análise de sistema biológicos e aprendizagem de máquina como análise de agrupamentos, componentes principais, gráficos de Venn, árvores de decisão, análise de vias, probabilidade predita e causa e efeito. Todos os parâmetros avaliados serão associados aos desfechos primários e secundários e comorbidades. Desfecho Primário: Identificação de biomarcadores preditivos de diagnóstico e evolução clínica dos pacientes acometidos com o vírus SARS-COV-2 permitirá melhor acompanhando dos pacientes, o que potencialmente implicará no aumento significativo de

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

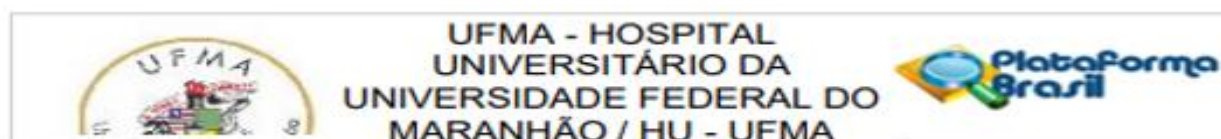
UF: MA

Telefone: (98)2109-1250

Município: SAO LUIS

CEP: 65.020-070

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 4.157.789

desfechos mais favoráveis para o paciente e para a saúde pública.

Tamanho da Amostra no Brasil: 120

Objetivo da Pesquisa:

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

-Caracterizar o perfil de mediadores imunológicos e bioquímicos circulantes em pacientes com COVID-19.

4.2 Objetivos Específicos

- Definir as assinaturas do perfil plasmático de citocinas pró-inflamatórias;
- Determinar o hemograma completo e o perfil de marcadores bioquímicos;
- Associar os biomarcadores laboratoriais com desfechos distintos (fase inicial x convalescença; alta x óbito e formas clínicas leve x grave).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

5. RISCOS

O possível risco do estudo está relacionado com o constrangimento ao ser identificado como infectado por COVID-19 (devido a relatos de preconceito pelo Brasil) e em responder aos questionamentos. Esses serão minimizados uma vez que, se respeitará a decisão do participante em não querer participar e/ou compartilhar seus dados pessoais e amostras biológicas. Além disso, a abordagem e questionamento aos participantes será realizada em local privativo, arejado/ventilado, com ética, respeito e garantia de sigilo dos dados e da identificação. Na coleta de sangue há risco de sentir leve dor ou desconforto local, mas serão tomadas as precauções adequadas para diminuir tais eventos, bem como um possível hematoma no local da coleta sanguínea. Se ocorrer hematoma o participante será instruído a colocar compressas de gelo por 15 minutos nas primeiras horas após a coleta. Se sentirem a necessidade os participantes também poderão colocar compressa morna para ajudar a eliminar o hematoma mais rapidamente. Porém, como este procedimento (coleta de material biológico) será realizado por profissional competente e experiente a probabilidade de esse fato ocorrer é mínima. Os pesquisadores estarão munidos de Equipamento de Proteção Individual (máscara cirúrgica, luvas para procedimentos, gorro, óculos de proteção e jaleco descartável e impermeável) para garantir sua própria proteção e proteção do participante. Será fornecido álcool gel para que os participantes possam utilizar, se acharem necessário ou adequado. Além disso, as amostras biológicas (pós coleta) serão submetidas a

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

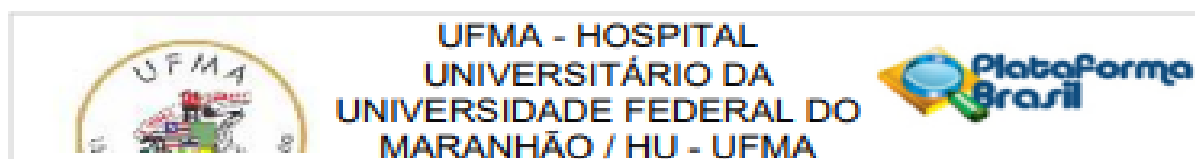
UF: MA

Município: SÃO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

CEP: 65.020-070

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 4.157.769

incidência de raios Ultra Violeta (UV) por 15 minutos, antes de iniciar a manipulação pelos pesquisadores, para minimizar a possível contaminação com a mesma.

6. BENEFÍCIOS

O estudo tem como benefícios a obtenção de dados importantes sobre o perfil clínico laboratorial do COVID-19. A partir da identificação dos biomarcadores preditivos de diagnóstico, eles poderão ser empregados para acompanhando dos pacientes, o que potencialmente implicar no aumento significativo de desfechos mais favoráveis para o paciente. O impacto social e epidemiológico virá da melhoria dos indicadores de saúde dos pacientes infectados pelo vírus atendidos pelos hospitais e pela diminuição da taxa de mortalidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pandemia mundial recente do SARS-CoV-2 atinge também o Brasil em proporções significativas (20/05/2020 - 291.579 casos acumulados/18.859 óbitos), reforçando a importância da busca de biomarcadores laboratoriais que possam auxiliar os profissionais de saúde a realizarem prognóstico mais adequado e manejo clínico-laboratorial mais eficaz dos pacientes com COVID-19. O propósito do estudo é caracterizar o perfil de mediadores imunológicos e bioquímicos circulantes em pacientes com COVID-19. Trata-se de uma pesquisa translacional, prospectiva e exploratória a ser realizada com pessoas adultos que procuraram laboratórios de análises clínicas com suspeita de COVID-19, na fase aguda e de convalescente da infecção. Serão avaliados mediadores solúveis inflamatórios, hemograma completo e parâmetros bioquímicos associando-os com comorbidades. As análises laboratoriais serão realizadas na Universidade Federal do Maranhão e no Instituto René Rachou-FIOCRUZ-Minas Gerais. A análise dos dados ocorrerá com o programa SPSS, STATA, Medcalc e os gráficos no GraphPad Prism 8. A proposta tem um diferencial inovador importante ao buscar identificar novas ferramentas para aplicação na rotina de acompanhamento clínico-laboratorial e que atualmente não são disponibilizadas para o acompanhamento clínico, bem como para tomada de decisões sobre o melhor tratamento de suporte e predição de quais pacientes precisarão ser acompanhados por tempo mais prolongado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo apresenta documentos referente aos "Termos de Apresentação Obrigatória": Folha de rosto, Declaração de compromisso em anexar os resultados na plataforma Brasil garantindo o sigilo, Orçamento financeiro detalhado, Cronograma com etapas detalhada, Termo de

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

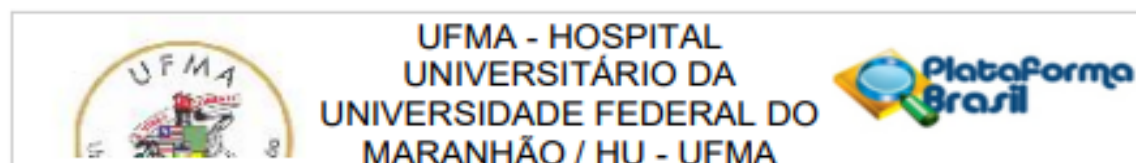
UF: MA

Telefone: (98)2169-1250

Município: SÃO LUIS

CEP: 65.020-070

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 4.157.769

Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), Autorização do Gestor responsável do local para a realização da coleta de dados e Projeto de Pesquisa Original na íntegra em Word. Atende à Norma Operacional nº 001/2013 (item 3/ 3.3). O protocolo apresenta ainda a declaração de responsabilidade financeira e termo de compromisso com a utilização dos dados resguardando o sigilo e a confidencialidade.

Recomendações:

Após o término da pesquisa o CEP-HUUFMA sugere que os resultados do estudo sejam devolvidos aos participantes da pesquisa ou a instituição que autorizou a coleta de dados de forma anonimizada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O PROTOCOLO não apresenta óbices éticos, portanto atende aos requisitos fundamentais da Resolução CNS/MS nº 466/12 e suas complementares, sendo considerado APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa-CEP-HUUFMA, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº.466/2012 e Norma Operacional nº. 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa proposto. Eventuais modificações ao protocolo devem ser inseridas à plataforma por meio de emendas de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente após a coleta de dados e ao término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1561812.pdf	10/07/2020 09:48:48		Aceito
Outros	suportefinaceiro.pdf	10/07/2020 09:48:34	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito
Outros	questionariocovid19cep.pdf	10/07/2020 09:47:35	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito
Outros	cartaresposta.pdf	10/07/2020 09:46:18	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

CEP: 65.020-070

E-mail: cep@huufma.br



**UFMA - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO / HU - UFMA**



Continuação do Parecer: 4.157.769

Outros	normativabiorrepositorioFIOCRUZ.pdf	10/07/2020 09:36:54	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorrepositoriosallyfiocruz.pdf	10/07/2020 09:32:17	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuenciagestaocovid19cepNOVO.pdf	08/07/2020 17:02:27	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito
Outros	aprovacaocomic.pdf	08/07/2020 17:01:25	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto completocovid19cep.pdf	08/07/2020 17:01:03	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termosassinadoscovid19cepNOVO.pdf	08/07/2020 17:00:12	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito
Cronograma	cronogramacovid19cep.pdf	08/07/2020 16:59:39	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle covid19cep.pdf	08/07/2020 16:59:25	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoassinada.pdf	08/07/2020 16:58:35	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito
Orçamento	orcamentocovid19cep.pdf	22/05/2020 13:24:01	SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

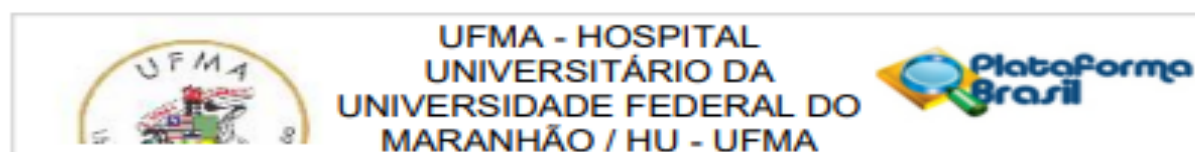
Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA **Município:** SÃO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 4.157.769

SAO LUIS, 16 de Julho de 2020

Assinado por:
Rita da Graça Carvalho Frazão Corrêa
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

UF: MA **Município:** SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

CEP: 65.020-070

E-mail: cep@huufma.br

ANEXO C

REGRAS DA REVISTA DO ARTIGO 01

ATENA EDITORA

Instruções aos Autores

Orientações Gerais: Respeitando as normas internacionais de boas práticas de editoração, a Atena Editora recebe os seguintes manuscritos para revisão por pares:

1. Anais de Congressos, Simpósios e Encontros de Pesquisa;
2. Artigos de Pesquisa Original;
3. Artigos de Revisão;
4. Comunicação Curta ou Resumo Expandido;
5. Contos;
6. Críticas literárias;
7. Dissertações de Mestrado;
8. Monografias;
9. Preprints (não submetidos a revisão por pares);
10. Relatórios de Pós-doc;
11. Teses de Doutorado;
12. Textos Independentes;
13. Trabalhos de Conclusão de Curso.

Autor Correspondente: O autor designado como correspondente é aquele que assume a responsabilidade pela comunicação com a Editora durante o processo de publicação do manuscrito e garante que todos os requisitos sejam atendidos e todas as atividades concluídas. O cadastro deste autor deve estar completo em nosso sistema, com endereço, telefone e e-mail.

Autoria: Todos os autores devem ter participado ativamente da construção do manuscrito, preferencialmente na:

- 1) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; 2) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante;
- 3) Aprovação final do manuscrito para submissão. Só devem ser incluídos no trabalho pesquisadores envolvidos no estudo. Não incluir, sob qualquer hipótese ou pretexto, nomes

que não tenham participado da elaboração do manuscrito.

Alterações na Autoria: Qualquer adição, exclusão ou reorganização de nomes de autores na lista de autoria deve ser efetuada antes do manuscrito ser submetido em nossa plataforma. Solicitações posteriores a submissão deverão vir somente do autor correspondente e acompanhada do motivo para a alteração na lista de autores e confirmação por escrito (pode ser carta digitalizada e anexada ao e-mail edicao@atenaeditora.com.br) de todos os autores de que eles concordam com a adição, remoção ou reorganização, bem como a concordância do autor a ser adicionado, alterado ou removido.

Considerações Adicionais:

- a) O manuscrito foi ortograficamente e gramaticalmente corrigido?
- b) Todas as referências mencionadas na lista de referências são citadas no texto e vice-versa?
- c) Todos os materiais subjacentes ao texto estão citados e referenciados corretamente?
- d) Todas as imagens, gráficos e fórmulas e demais elementos visuais estão em formato jpeg ou png?
- e) Todas as ilustrações estão no local exato no texto e não ao final?
- f) O manuscrito foi revisado por algum dispositivo antiplágio?
- g) O manuscrito envolve o uso de animais ou dados de seres humanos (avaliação de prontuários, entrevistas, etc.)? Em caso positivo indicar o número do CAAE (Certificado de Apresentação de Apreciação Ética) e a data de aprovação do CEP (Comitê de Ética em Pesquisa), no item “Metodologia”;
- h) O manuscrito está isento de dados ou resultados fraudulentos?
 - i) O manuscrito foi depositado em alguma plataforma de preprint? Em caso positivo indicar o endereço do depósito;
 - j) Houve depósito dos dados aberto da pesquisa? Em caso positivo indicar o endereço do depósito;
 - k) Foi reportado qualquer conflito de interesses de todos os autores?
- l) Todas as fontes de financiamento foram informadas?

Vídeo: A Atena Editora aceita vídeo e/ou sequências de animação (somente no formato .mp4) para aprimorar o conhecimento científico do manuscrito bem como para apoiar a sua disseminação. Todos os arquivos enviados devem ser rotulados adequadamente, para que possamos relacionar o conteúdo do vídeo ao texto. Os arquivos de vídeo e/ou animação

fornecidos serão embedados em nossa página e quando possível em repositórios parceiros.

Normas para Formatação do Manuscrito

TÍTULO DO TRABALHO EM LÍNGUA PORTUGUESA

TÍTULO DO TRABALHO EM LÍNGUA INGLESA

Primeiro Autor, nome completo sem abreviaturas

Instituição de Ensino, Faculdade ou Departamento Cidade – Estado

Link para o Currículo Lattes ou ORCID

Segundo Autor, nome completo sem abreviaturas

Instituição de Ensino, Faculdade ou Departamento Cidade – Estado

Link para o Currículo Lattes ou ORCID

Terceiro Autor, nome completo sem abreviaturas

Instituição de Ensino, Faculdade ou Departamento Cidade – Estado

Link para o Currículo Lattes ou ORCID

Demais autores....

Data de submissão: Preencher com a data (xx/xx/xxxx) em que o manuscrito foi submetido no sistema.

RESUMO: Favor atender às seguintes normas de formatação: a) o artigo deve ter no máximo 15 páginas (páginas excedentes, no valor de R\$ 13,00 por lauda, serão cobradas posteriormente a submissão) de tamanho em folha A4 (21 x 29,7 cm), cada qual com margens superior e inferior iguais a 2,5 cm e esquerda e direita iguais a 3,0 cm; b) use fonte Arial tamanho 12 pontos para todo o corpo de texto (exceto citação direta longa e títulos de tabelas, figuras e gráficos, que deverão ser em fonte 10 pontos); c) prepare um resumo com 300 palavras no máximo, espaçamento simples e alinhamento justificado; d) as referências devem ser listadas em ordem alfabética ao final do trabalho; e) as figuras/gráficos/fórmulas e ilustrações incluídas no trabalho devem ser de excelente qualidade, inseridas no texto em formato “png” ou “jpeg”; f) Evite o uso excessivo de nota de rodapé e/ou nota de fim. O trabalho deverá ser preparado em Português, Inglês, Espanhol ou Francês. Use este texto como modelo.

PALAVRAS-CHAVE: No máximo cinco palavras-chave.

ABSTRACT: Tradução para o Inglês do Resumo. Não utilize tradutores instantâneos de palavras, pois o mesmo pode alterar o sentido do texto. Lembre-se que um bom resumo deve conter o foco da pesquisa, a metodologia empregada, os resultados e principais conclusões. A Atena Editora aceita Visual Abstract como Resumo.

KEYWORDS: Palavras chaves em Inglês.

1. INTRODUÇÃO

O artigo será publicado como capítulo de livro, em formato e-book, no site da Atena Editora, no Slide Share, GoodReads do Grupo Amazon, Google Books e estamos em processo de avaliação para indexação no SciELO Livros. Eventualmente poderão ser disponibilizados em sites de editoras parceiras e repositórios. Os coordenadores das Grandes Áreas, serão os organizadores de cada obra. Entre uma sessão e outra, deixe duas linhas, e entre a sessão e o texto deixe uma linha. Use este texto como modelo.

2. INSTRUÇÕES PARA DIGITAÇÃO

O trabalho deve ser digitado no Word for Windows e não deve ser paginado. O título do trabalho em Língua Inglesa deve ser apresentado logo após o título do trabalho em Língua Portuguesa. O Abstract e as Keywords, devem ser apresentados após o resumo, em espaçamento simples, tal qual o resumo em língua portuguesa. Use este texto como modelo.

3. ESPECIFICAÇÕES GERAIS PARA A FORMATAÇÃO DO TEXTO

O corpo do artigo deve ser digitado em fonte Arial tamanho 12 pontos, espaçamento de 1,5 cm e sem qualquer espaçamento entre os parágrafos. O título deve ser em digitado em letra maiúscula, fonte 12 pontos, negrito e centralizado. Citações diretas longas deverão estar em fonte 10, com recuo de 4 cm da margem. Títulos de figuras, gráficos, fórmulas e tabelas, também devem estar em tamanho 10 pontos. Todas as sessões deverão ser numeradas.

4. AUTORES

O artigo deve ter no máximo 12 autores (casos especiais serão analisados individualmente). A submissão do artigo deve ser feita preferencialmente pelo primeiro autor, que será denominado autor correspondente, assim como todos os contatos sobre a publicação do mesmo.

5. AUTORIZAÇÕES/RECONHECIMENTO

Ao submeter o trabalho, os autores tornam-se responsáveis por todo o conteúdo da obra.

6. CITAÇÕES

Conforme as normas da ABNT.

REFERÊNCIAS

Apresentadas em ordem alfabética e de acordo com a norma da ABNT - NBR 6023/2018, com o título das obras em **negrito**. Deixar uma linha entre uma referência e outra.

ANEXO D

DECLARAÇÃO DE ACEITE DO ARTIGO 01

DECLARAÇÃO DE ACEITE

A Atena Editora, especializada na publicação de livros e coletâneas de artigos científicos em todas as áreas do conhecimento, com sede na cidade de Ponta Grossa-PR, declara que após avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta editora, o artigo intitulado "PREDIÇÃO DA SEVERIDADE DA COVID-19 ATRAVÉS DE MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E HEMATOLÓGICOS" de autoria de "ALICE DE SÁ FERREIRA, ALESSANDRA COSTA DE SALES MUNIZ, CARLA DÉA TRINDADE BARBOSA, KARINA DONATO FOOK, MÔNICA MACHADO DE CARVALHO, DÉBORAH ROCHA DE ARAÚJO GOMES, ANA CLÉA CUTRIM DINIZ DE MORAIS, MARILDE ABREU DINIZ, ANDREA TEXEIRA DE CARVALHO, SALLY CRISTINA MOUTINHO MONTEIRO, MARIA FERNANDA LIMA BERTOLACCINI, MALENE LIMA GOMES SODRÉ", foi aprovado e encontra-se no prelo para publicação no livro eletrônico "Ciencias de la salud: Oferta, acceso y uso" a ser divulgado em maio de 2022.

Agradeço a escolha pela Atena Editora como meio de transmitir ao público científico e acadêmico o trabalho e parabeno os autores pelo aceite de publicação.

Reitero protestos de mais elevada estima e consideração.

PONTA GROSSA, 15 de maio de 2022.

Prof.ª Dr.ª Antonella Carvalho de Oliveira
Editora Chefe
ATENA EDITORA

PREFIXO EDITORIAL DOI 10.22533

PREFIXO EDITORIAL ISBN 93243

Certificado digitalmente por Atena Edição de Livros

RUA ANTONIO RODRIGUES
TEIXEIRA JUNIOR, 122, Jardim
Carvalho
PONTA GROSSA - PR - CEP:
84015-490

(42) 3323-5493
(42) 99955-2866
www.atenaeditora.com.br

Atena
Editora

ANEXO E

REGRAS DA REVISTA DO ARTIGO 02

Journal of Medical Virology

Author Guidelines

INSTRUCTIONS FOR CONTRIBUTORS

AIMS AND SCOPE

Journal of Medical Virology provides a means of rapid publication of original scientific papers on fundamental as well as applied research concerning viruses affecting humans. These include reports describing the characterisation, diagnosis, epidemiology, immunology and pathogenesis of human virus infection, as well as basic studies on virus morphology, genetics, replication and host-cell interactions.

ARTICLE TYPES FOR SUBMISSION

Research Articles describe significant, original, and complete findings in medical virology. A Research Article consists of an Abstract of no more than 200 words, Text of no more than 4,000 words (including Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion), no more than 50 References, and illustrations that are limited to 8 items (figures and tables).

Short Communications describe important, original, and urgent observations that are narrower in scope than those described in Research Articles. A Short Communication consists of an Abstract of no more than 200 words, Text of no more than 2,000 words (including Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion), no more than 20 References, and illustrations that are limited to 4 items (figures and tables).

Reviews are invited by the Editor. They cover the most up-to-date and significant advancements in the field. A Review consists of an Abstract of no more than 150 words, Text of no more than 5,000 words, no more than 100 References, and illustrations that are limited to 4 items (figures and tables). Please do not submit unsolicited Reviews.

Commentaries provide observation or analysis of an article. They typically appear in the same issue as the original article but may refer to any article published within the preceding 12 months. They are provided by the journal Editor or a peer reviewer. They may also be submitted by authors on an invite-only basis. Commentaries should be submitted in letter format with a maximum of 1,000 words, 10 references, and 1 item.

Letters to the Editor are critiques of articles published in JMV in the last 12 months. It can also address an urgent topic, a significant case report or case series. A Letter should not exceed 750 words and contain no more than 12 references and 2 items (figure or table).

For all clinical and epidemiological studies, the manuscript should state clearly the approval of institutional review boards, the study design, sampling strategy, the inclusion criteria of subjects, a summary of the key clinical and pathological data of the study groups.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

(Online publication only) Supplemental material should be submitted with the manuscript for peer-review and approval by the Editors. Supplemental material, which should be referenced in the body of the main text, can include figures, tables, movies, and animations. We recommend using the following file types: Word Doc or PDF for text, tif or eps format for images, and movies in mov, wmv, mpg, or avi format. Online-only Supplemental Material will be published as submitted. It will not be copyedited or formatted by the publisher in any way. The accuracy and presentation of Supplemental Material is the sole responsibility of the authors. Please try to restrict individual file sizes to 10Mb maximum (zipped or unzipped).

NOTE: The journal no longer accepts Case Studies.

SUBMISSIONS

It is the responsibility of the authors to ensure the manuscript is complete and correct before submission. Upon the issuing of an ‘accept’ decision, the manuscript cannot be withdrawn. Any requests for a post-acceptance withdrawal will need to be strongly justified and will be assessed by the Editor-in-Chief and the publisher.

All manuscripts should be submitted electronically via the [Research Exchange \(ReX\) submission portal](#). Should your manuscript proceed to the revision stage, you will be directed to make your revisions via the same submission portal. You may check the status of your submission at anytime by logging on to submission.wiley.com and clicking the “My Submissions” button. For technical help with the submission system, please review our [FAQs](#) or contact submissionhelp@wiley.com.

If submitting your manuscript file in LaTeX format via Research Exchange, select the file designation “Main Document – LaTeX .tex File” on upload. When submitting a Latex Main Document, you must also provide a PDF version of the manuscript for Peer Review. Please upload this file as “Main Document - LaTeX PDF.” All supporting files that are referred to in the Latex Main Document should be uploaded as a “LaTeX Supplementary File”.

Free Format submission

Journal of Medical Virology now offers [Free Format submission](#) for a simplified and streamlined submission process.

Before you submit, you will need:

- **Your manuscript:** this should be an editable file including text, figures, and tables, or separate files – whichever you prefer. All required sections should be contained in your manuscript, including abstract, introduction, methods, results, and conclusions. Figures and tables should have legends. Figures should be uploaded in the highest resolution possible. If the figures are not of sufficiently high quality your manuscript may be delayed.] References may be submitted in any style or format, as long as it is consistent throughout the manuscript. Supporting information should be submitted in separate files. If the manuscript, figures or tables are difficult for you to read, they will also be difficult for the editors and reviewers, and the editorial office will send it back

to you for revision. Your manuscript may also be sent back to you for revision if the quality of English language is poor.

- An ORCID ID, freely available at <https://orcid.org>. (*Why is this important? Your article, if accepted and published, will be attached to your ORCID profile. Institutions and funders are increasingly requiring authors to have ORCID IDs.*)
- The title page of the manuscript, including:
 - Your co-author details, including affiliation and email address. (*Why is this important? We need to keep all co-authors informed of the outcome of the peer review process.*)
 - Statements relating to our ethics and integrity policies, which may include any of the following (*Why are these important? We need to uphold rigorous ethical standards for the research we consider for publication*):
- data availability statement
- funding statement
- conflict of interest disclosure
- ethics approval statement
- patient consent statement
- permission to reproduce material from other sources
- clinical trial registration

To submit, login at [JMV submission site](#) and create a new submission. Follow the submission steps as required and submit the manuscript.

Number all pages in sequence and begin each section on a new page. Manuscripts should be divided into the following sections:

TITLE PAGE. This should contain the complete title of the paper; the names, titles, and affiliations of all authors (lists of degrees and diplomas should not be included); the institution at which the work was performed; the name, address, telephone, and institutional email address for the corresponding author; and a shortened title, not more than 40 characters, to be used as a running head.

ABSTRACT. This should be a factual condensation of the entire work and include statements of the problem, method of study, results, and conclusions. The abstract may not exceed 250 words.

KEY WORDS. Supply a list of three to six key words (it is okay to repeat words in the title), pertinent to the article, which will appear below the abstract and will be included in the index at the end of the volume.

SEARCH ENGINE OPTIMIZATION. Driving usage and readership is critically important to raising the visibility of your published research. One of the key factors in sustaining long-term usage is through search engine optimization (SEO). Below is a list of suggested ways of maximizing your SEO.

1. Make sure your article title is SEO-friendly. It should be descriptive, and it must include a key phrase from your topic.
2. Provide up to five topic-specific key words or phrases in the key word field.

3. Be sure your key words and phrases appear in your abstract several times, but don't go overboard or the search engine may kick you out.
 4. When referencing authors, be consistent. Use their names as they generally appear in past online publications.
 5. When appropriate, use your key words in article section headings.
- Remember: They can't read it if they can't find it!

For more detailed information on SEO, including helpful examples, go to <http://authorservices.wiley.com/bauthor/seo.asp>.

VIRUS NOMENCLATURE. Each virus should be identified at least once, preferably in the *Introduction* or *Materials and Methods* section, using formal family, genus, and species terms, and where possible by using a precise strain designation term as developed by an internationally recognized specialty group or culture collection. Please note that the word type is not used before species designations that include a number. Formal terms used for virus families, genera, and species, should be those approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV): Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., McGeoch, D.J., Maniloff, J., Mayo, M.A., Pringle, C.R., and Wickner, R.B. *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses*, Seventh ICTV Report, Academic Press. This volume also includes standard abbreviations for species. Once formal taxonomic names have been given in a paper, vernacular terms may be used.

Formal taxonomic nomenclature

In formal taxonomic usage, the first letters of virus order, family, subfamily, genus and species names are capitalized and the terms are printed in italics. Other words in the species name are not capitalized unless they are proper nouns or parts of nouns, for example *West Nile virus*. Informal usage, the name of the taxon should precede the term for the taxonomic unit; for example: "the family *Paramyxoviridae*," "the genus *Morbillivirus*." The following represent examples of full formal taxonomic terminology:

- 1 Order *Mononegavirales*, Family *Rhabdoviridae*, genus *Lyssavirus*, Species *Rabies virus*.
- 2 Family *Poxviridae*, subfamily *Chordopoxvirinae*, genus *Orthopoxvirus*, species *Vaccinia virus*.
- 3 Family *Picornaviridae*, genus *Enterovirus*, species *Poliovirus*.
- 4 Family *Bunyaviridae*, genus *Tospovirus*, species *Tomato spotted wilt virus*.

Vernacular taxonomic nomenclature

In formal vernacular usage, virus order, family, subfamily, genus and species names are written in lower case Roman script; they are not capitalized, nor are they printed in italics or underlined. In informal usage, the name of the taxon should not include the formal suffix, and the name of the taxon should follow the term for the taxonomic unit; for example "the picornavirus family," "the enterovirus genus." One particular source of ambiguity in vernacular nomenclature lies in the common use of the same root terms in formal family, genus or species names. Imprecision stems from not being able to easily identify in vernacular usage which hierarchical level is being cited. For example, the vernacular name "paramyxovirus" might refer to the family *Paramyxoviridae*, the subfamily *Paramyxovirinae*, or one species in the genus *Respirovirus*, such as *Human parainfluenza virus 1*. The solution in vernacular usage is to avoid "jumping" hierarchical levels and to add taxon identification wherever needed. For example, when citing the taxonomic placement of *Human parainfluenza*

virus 1, taxon identification should always be added: " *Human parainfluenza virus 1* is a species in the genus *Respirovirus*, family *Paramyxoviridae*." In this example, as is usually the case, adding the information that this virus is also a member of the subfamily *Paramyxovirinae* and the order *Mononegavirales* is unnecessary.

It should be stressed that italics and capitals initial letters need to be used only if the species name refers to the taxonomic category. When the name refers to viral objects such as virions present in a preparation or seen in an electron micrograph, italics and capitals initial letters are not needed and the names are written in lower case Roman script. This also applies when the names are used in adjectival form, for instance tobacco mosaic virus polymerase. The use of italics when referring to the name of a species as a taxonomic entity signals that it has the status of an officially recognized species. The 7th ICTV Report (Van Regenmortel, M.H.V. et al., 1999, Academic Press) should be consulted to ascertain which names have been approved as official species names. When the taxonomic status of a new putative species is uncertain or its position within an established genus has not been clarified, it is considered a tentative species and its name is not written in italics although its initial letter is capitalized.

TEXT:

It is essential that authors whose "first" language is not English should arrange for their manuscripts to be written in idiomatic English prior to submission. Authors may use either English or American style; for the former, consult the Oxford Shorter Dictionary; for the latter, consult Merriam-Webster's. Manuscripts reporting the results of experimental investigations on human subjects must include a statement to the effect that procedures had received official institutional and ethical approval. Refer to patients by number (or, in anecdotal reports, by anonymous initials). The pronouns "we" and "our" should not be used. Split-infinitives should be avoided. Full names or identifiable designations should not be used in the text, tables, or illustrations. All measurements are to be in metric units. Avoid excessive use of acronyms and do not use unusual abbreviations. Species names should be in italics and have the first letter of the first word capitalized. All other words in the name should not be capitalized unless they are proper nouns or parts of nouns. Place acknowledgements as the last element of the text, before references.

REFERENCES:

All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. In text citations should cite references in consecutive order using Arabic superscript numerals. Sample references follow:

Journal article: King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *J Comp Neurol* 1998;390:537-551.

Book: Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 p.

Please note that journal title abbreviations should conform to the practices of Chemical Abstracts. For more information about AMA reference style - [AMA Manual of Style](#)

LEGENDS. A descriptive legend must accompany each illustration and must define all abbreviations used therein.

TABLES. Each table must have a title. They should be numbered in order of appearance with Roman numerals and be keyed into the text.

ILLUSTRATIONS. To ensure highest print quality, your figures must be submitted in TIF format according to the following minimum resolutions:

1200 dpi (dots per inch) for black and white line art (simple bar graphs, charts, etc.)

300 dpi for halftones (black and white photographs)

600 dpi for combination halftones (photographs that also contain line art such as labeling or thin lines)

COLOR ART. In addition to the above resolution guidelines, color art must be submitted in CMYK color space. Do not submit color figures in RGB.

UNACCEPTABLE FORMATS. Do not submit figures in the following formats: JPG, GIF, PSD, CRD, PCT, PPT, PDF, XLS, DOC, BMP, 123 (or other Lotus formats).

GUIDELINES FOR COVER SUBMISSIONS. If you would like to send suggestions for artwork related to your manuscript to be considered to appear on the cover of the journal, please [follow these general guidelines](#).

Article Preparation Support

[Wiley Editing Services](#) offers expert help with English Language Editing, as well as translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical abstract design – so you can submit your manuscript with confidence.

Also, check out our resources for [Preparing Your Article](#) for general guidance about writing and preparing your manuscript.

EDITORIAL POLICIES

ALL MANUSCRIPTS submitted to the Journal of Medical Virology must be submitted solely to this journal, may not have been published in any part, language, or form in another publication of any type, professional or lay, and becomes the property of the publisher. The publisher reserves copyright, and no published material may be reproduced or published elsewhere without the written permission of the publisher and the author. The journal will not be responsible for the loss of manuscripts at any time. All statements in, or omissions from, published manuscripts are the responsibility of the authors who will assist the editors by reviewing proofs before publication. Reprint order forms will be sent with page proofs. No page charges will be levied against authors or their institutions for publication in the journal.

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at <https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html>.

ORCID iD

This journal encourages authors to get ORCID. Please refer to [Wiley's resources on ORCID](#).

Wiley's Author Name Change Policy

In cases where authors wish to change their name following publication, Wiley will update and republish the paper and redeliver the updated metadata to indexing services. Our editorial and production teams will use discretion in recognizing that name changes may be of a sensitive and private nature for various reasons including (but not limited to) alignment with gender identity, or as a result of marriage, divorce, or religious conversion. Accordingly, to protect the author's privacy, we will not publish a correction notice to the paper, and we will not notify co-authors of the change. Authors should contact the journal's Editorial Office with their name change request.

Disclosure of Conflicts of Interest. Authors must disclose in the manuscript any financial or other conflict of interest that might be construed to influence the contents of the manuscript, including the results or interpretation of publication. All sources of financial support for the study must be disclosed and acknowledged.

Wiley Data Sharing Policies *Journal of Medical Virology* expects that data supporting the results in the paper will be archived in an appropriate public repository. Authors are required to provide a data availability statement to describe the availability or the absence of shared data. When data have been shared, authors are required to include in their data availability statement a link to the repository they have used, and to cite the data they have shared. Whenever possible the scripts and other artefacts used to generate the analyses presented in the paper should also be publicly archived. If sharing data compromises ethical standards or legal requirements then authors are not expected to share it. Please see our [Wiley Data Sharing Policies](#) page for more information.

Experimental Ethics. In cases where a study involves the use of live animals or human subjects, authors must include in the appropriate section of the manuscript a statement that all experiments were performed in compliance with relevant laws and institutional guidelines and in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki. The institutional committees that have approved the experiments must be named.

Authors must also include a statement that **informed consent** was obtained for any experimentation with human subjects including human volunteers.

Such statements should be repeated in the text of the article under the "Materials and Methods" or "Patients and Methods" section.

(This experimental ethics policy has been informed by and adapted from the ethical guidelines authored by EuChemS-the European Association for Chemical and Molecular Sciences. For more information, see <http://www.euchems.org/Publications/index.asp>.)

For authors signing the copyright transfer agreement:

If the Open Access option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing Open Access

If the Open Access option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the Open Access option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:

Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>

Self-Archiving Definitions and Policies: Note that the journal's standard copyright agreement allows for [self-archiving](#) of different versions of the article under specific conditions.

Open Access fees: If you choose to publish using Open Access you will be charged a fee. A list of Article Publication Charges for Wiley journals is available [here](#).