

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical

Luciana Santiago

**PERFIL DE CITOCINAS PULMONARES E SISTÊMICAS EM PACIENTES COM
COVID-19 GRAVE INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA**

Belo Horizonte

2023

Luciana Santiago

**PERFIL DE CITOCINAS PULMONARES E SISTÊMICAS EM PACIENTES COM
COVID-19 GRAVE INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA**

Versão Final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadores: Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Júnior e Prof. Dr. Helton da Costa Santiago

Coorientadoras: Dra. Marcela Helena Gonçalves Pereira e Prof.^a Dra. Cecília Gómez Ravetti

Belo Horizonte

2023

S235p Santiago, Luciana.
Perfil de citocinas pulmonares e sistêmicas em pacientes com COVID-19 grave internados em Unidade de Terapia Intensiva [recursos eletrônicos]. / Luciana Santiago. - - Belo Horizonte: 2023.

97 f.: il.

Formato: PDF.

Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Vandack Alencar Nobre Júnior ; Helton da Costa Santiago

Coorientador (a): Marcela Helena Gonçalves Pereira ; Cecília Gómez Ravetti

Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. SARS-CoV-2. 2. COVID-19. 3. Citocinas. 4. Pulmão. 5. Unidades de Terapia Intensiva. 6. Estudo Observacional. 7. Estudos Prospectivos. 8. Dissertação Acadêmica. I. Nobre Júnior, Vandack Alencar. II. Santiago, Helton da Costa. III. Pereira, Marcela Helena Gonçalves. IV. Ravetti, Cecília Gómez. V. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. VI. Título.

NLM: QW 568



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Às **14:00** horas do dia 26 de junho de 2023, videoconferência Telessaúde, 1 andar, ala oeste, HC/UFMG (<https://meet.google.com/wts-fmzo-fjk>), realizou-se a sessão pública para a 426ª defesa de dissertação de **LUCIANA SANTIAGO**, número de registro 2021652402, graduada no curso de FISIOTERAPIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS DA SAÚDE. A presidência da sessão coube ao professor **VANDACK ALENCAR NOBRE JÚNIOR**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **PROF. JOSÉ CARLOS FARIAS ALVES FILHO (USP)**, **PROF. ALEXANDRE GUIMARÃES DE ALMEIDA BARROS (UFMG)**, **PROFA. CECILIA GÓMEZ RAVETTI – COORIENTADORA (UFMG)**, **PROFA. MARCELA HELENA GONÇALVES PEREIRA – COORIENTADORA (UFMG)**, **PROF. HELTON DA COSTA SANTIAGO – ORIENTAÇÃO DUPLA (UFMG)**, **PROF. VANDACK ALENCAR NOBRE JÚNIOR - ORIENTADOR (UFMG)**. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: **"PERFIL DE CITOCINAS PULMONARES E SISTÊMICAS EM PACIENTES COM COVID-19 GRAVE INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA"**. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA a DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 26 de junho de 2023.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **José Carlos Farias Alves Filho, Usuário Externo**, em 26/06/2023, às 16:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helton da Costa Santiago, Professor do Magistério Superior**, em 27/06/2023, às 17:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcela Helena Gonçalves Pereira de Oliveira, Usuária Externa**, em 29/06/2023, às 09:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vandack Alencar Nobre Junior, Professor do Magistério Superior**, em 29/06/2023, às 10:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Guimarães de Almeida Barros, Professor do Magistério Superior**, em 29/06/2023, às 11:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cecilia Gomez Ravetti, Professora do Magistério Superior**, em 03/07/2023, às 19:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2396969** e o código CRC **98E2F5CA**.

“Porque o SENHOR dá a sabedoria; da sua boca é que vem o conhecimento e o entendimento.”

Provérbios 2:6

“...felizes são aqueles que ouvem a palavra de Deus e lhe obedecem.”

Lucas 11:28b

AGRADECIMENTOS

Ao único, incrível e maravilhoso Deus, que me deu capacidade, inteligência e força para concluir este trabalho. Agradeço-te de todo o coração.

Aos meus pais, Gilton e Eli Maria, pela sustentação e orações imprescindíveis. A minha família, pelo apoio, em especial do meu irmão Helton, que me impulsionou com a ideia de um mestrado num café sábado à tarde, e ao meu tio Ronaldo, a quem admiro tanto, que fez a revisão gramatical.

À Lídia, amiga e colega de profissão; seu apoio foi de extrema importância. Ao Javier, pelo apoio inicial.

Ao meu orientador Vandack Nobre – seu sobrenome reflete sua competência e caráter. Serei eternamente agradecida por todo ensino, correção, tempo e generosidade dispensados.

Ao meu orientador Helton C. Santiago, que no passado me ensinou a pipetar, foi meu colega de iniciação científica e, hoje, tenho o privilégio de tê-lo como professor, meu orgulho e gratidão.

Às minhas coorientadoras, Dra. Marcela e Dra. Cecília, sempre prontas a orientar e a corrigir. Fui premiada com a presença de vocês duas neste trabalho.

À Dra. Paula pela acolhida e ajuda em todo o processo. Você é muito preciosa.

Ao Prof. Marcos, Prof. Renan e Mariana, pela ajuda e apoio na realização da leitura das citocinas.

À Prof.^a Daniele e à Raquel por ajudarem na amplificação da pesquisa dos dados coletados.

Aos amigos dos laboratórios NIIMI, IMPAR e Professor Lineu Freire Maia, minha gratidão pelo suporte. E a toda a equipe do CTI 3º leste, do laboratório e do setor de imagem do HC-UFMG, pelo trabalho prestado de forma gentil. Às minhas colegas fisioterapeutas e minhas chefes Bárbara e Anna Scalzo, vocês foram fundamentais para que eu pudesse fazer as matérias e escrever esta dissertação. Obrigada por permitirem as trocas de plantão.

A todos os pacientes e familiares. Sem vocês este estudo não seria possível. Muito agradecida pela confiança depositada. Histórias de vida que marcaram a minha.

A todos, minha eterna gratidão.

RESUMO

Introdução: A COVID-19 pode evoluir para um estado crítico e fatal, associado a padrões alterados de citocinas e quimiocinas. Relatos recentes apontam diferença nas características da resposta inflamatória nos sítios sistêmico e pulmonar. No entanto ainda há poucos estudos que comparem o perfil dessas moléculas nesses dois sítios. **Objetivo:** Estudar o perfil de citocinas e quimiocinas pulmonares e sistêmicas em pacientes críticos com COVID-19. **Métodos:** Estudo observacional, prospectivo, realizado na unidade de terapia intensiva do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, de maio de 2020 a abril de 2021. Foram incluídos pacientes adultos (≥ 18 anos) com COVID-19 confirmada por RT-PCR, sob ventilação mecânica invasiva. Os pacientes foram acompanhados até o desfecho (óbito ou alta hospitalar) e divididos em dois grupos (sobreviventes e não sobreviventes) para as análises comparativas. A concentração de 18 citocinas e quimiocinas foi mensurada em amostras de sangue periférico e de secreção pulmonar (minilavado broncoalveolar - mini-BAL) coletadas em dois momentos diferentes: 1º ou 2º dia (D1-2) e 5º a 8º dia (D5-8) após a intubação orotraqueal. **Resultados:** Foram incluídos 34 pacientes com COVID-19 crítica, sendo 16 sobreviventes e 18 não sobreviventes, com mediana de 58 (41-70) anos, sendo mais frequente o sexo masculino (62%). As principais comorbidades foram hipertensão arterial sistêmica (16%), diabetes melito (12%) e doenças cardiovasculares (9%), sem diferença entre os sobreviventes e não sobreviventes. Não houve diferença, também, na gravidade clínica à admissão, avaliada através do escore SOFA ($p=0,66$) e APACHE II ($p=0,23$). No mini-BAL do grupo sobrevivente houve níveis mais elevados de CCL4 ($p=0,01$) no D1-2 e maiores níveis de IFN- γ ($p=0,01$), IL-2 ($p=0,01$), IL-4 ($p=0,03$), G-CSF ($p=0,01$) e IL-10 ($p=0,02$) no D5-8, quando comparados aos não sobreviventes. Por outro lado, o grupo não sobrevivente apresentou níveis plasmáticos mais elevados de CXCL10 ($p=0,02$) e IL-6 ($p=0,02$) nos dias D1-2 e de CCL2 ($p=0,007$), CCL4 ($p=0,03$), CXCL8 ($p=0,04$) e IL-6 ($p=0,04$) nos dias D5-8, comparado com os sobreviventes. Nos dias D1-2, maiores níveis de TNF ($p=0,02$) e CXCL8 ($p=0,04$) no pulmão associaram-se a $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \geq 150$ mmHg, enquanto $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 150$ mmHg esteve associado a maiores níveis de plasmáticos de IFN- γ ($p=0,004$) e IL-5 ($p=0,01$). Houve forte correlação entre as citocinas e quimiocinas analisadas separadamente no território pulmonar e plasmático nos momentos D1-2 e D5-8, mas os níveis dessas moléculas não se correlacionaram quando o plasma e pulmões foram comparados entre si. **Conclusão:** Nossos resultados sugerem que os processos inflamatórios que ocorrem no território pulmonar e periférico são regulados diferentemente em pacientes com COVID-19 crítica. Níveis mais elevados de citocinas pulmonares associaram-se

a menor mortalidade e melhor oxigenação, ao passo que níveis plasmáticos mais elevados de citocinas foram associados a óbito e a uma pior capacidade de oxigenação (relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) no início da fase crítica da infecção.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; COVID-19; citocinas; quimiocinas; pulmão; unidade de terapia intensiva; estudo observacional; estudo prospectivo.

ABSTRACT

Introduction: The evolution of COVID-19 into a critical and fatal state has been associated with altered patterns of cytokines and chemokines. Recent reports have pointed to distinct inflammatory processes in systemic and pulmonary sites. However, studies comparing the profile of these molecules in these two sites are still scarce. **Objective:** To study the profile of pulmonary and systemic cytokines and chemokines in critically ill COVID-19 patients. **Methods:** Prospective observational study conducted in the intensive care unit of the Hospital das Clínicas of the Federal University of Minas Gerais, from May 2020 to April 2021. Adult patients, (≥ 18 years) with confirmed COVID-19 by RT-PCR, who were on invasive mechanical ventilation were included. Patients were followed until outcome (death or hospital discharge) and divided into two groups (survivors and non-survivors) for comparative analyses. The concentration of 18 cytokines and chemokines was measured in peripheral blood samples and pulmonary secretion (mini-bronchoalveolar lavage (mini-BAL)) collected at two-time points after orotracheal intubation: days 1 or 2 (D1-2) and days 5 to 8 (D5-8). **Results:** Thirty-four patients with critical COVID-19 were included, 16 survivors and 18 non-survivors, with a median age of 58 (41-70) years, and male gender being the most frequent (62%). The main comorbidities were systemic arterial hypertension (16%), diabetes mellitus (12%), and cardiovascular diseases (9%), but there was no significant difference between survivors and non-survivors. The groups were similar at admission regarding severity evaluate by SOFA ($p=0.66$) and APACHE II ($p=0.23$) scores. In the mini-BAL, higher levels of CCL4 ($p=0.01$) were observed in the survivors' group on D1-2, and higher levels of IFN- γ ($p=0.01$), IL-2 ($p=0.01$), IL-4 ($p=0.03$), G-CSF ($p=0.01$), and IL-10 ($p=0.02$) on D5-8 when compared to non-survivors. On the other hand, the non-survivors group presented higher plasma levels of CXCL10 ($p=0.02$) and IL-6 ($p=0.02$) at the D1-2 point and of CCL2 ($p=0.007$), CCL4 ($p=0.03$), CXCL8 ($p=0.04$), and IL-6 ($p=0.04$) on D5-8, compared to survivors. At D1-2, higher levels of TNF ($p=0.02$) and CXCL8 ($p=0.04$) in the lung were associated with $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \geq 150$ mmHg, while $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 150$ mmHg was associated with higher plasma levels of IFN- γ ($p=0,004$) and IL-5 ($p=0,01$). There was a strong correlation between cytokines and chemokines tested when analyzed separately in the pulmonary and plasma compartments on D1-2 and D5-8, but the levels of these molecules did not correlate when plasma and lungs were compared. **Conclusion:** Our results suggest that the inflammatory processes occurring in the pulmonary and peripheral territories are regulated differently in patients with critical COVID-19. Higher levels of pulmonary cytokines were associated with lower mortality and better lung oxygen

exchange capacity, while higher plasma levels of cytokines were associated with death and worse lung exchange function ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio) in the early phase of the critical infection.

Keywords: SARS-CoV-2; COVID-19; cytokines; chemokines; lung; intensive care unit; observational study; prospective study.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Entrada do SARS-CoV-2 na célula hospedeira..... | 20 |
| Figura 2: Sinalização dos INFs do tipo I e III..... | 23 |
| Figura 3: Um modelo integrado da resposta imune e a gravidade no COVID-19..... | 28 |

Artigo original

| | |
|--|----|
| Figure 1. Correlation matrix of cytokines levels and laboratory parameters within and between lung and plasma..... | 44 |
| Figure 2. Levels of chemokines in survival and non-survivors` group | 47 |
| Figure 3. Levels of cytokines in survival and non-survivors` group..... | 48 |
| Figure 4. Cytokines/chemokines when $PaO_2/FiO_2 < 150\text{mmHg}$ | 50 |
| Figure S1. Samples of survivors and non-survivors` groups..... | 56 |
| Figure S2. Levels of cytokines in survival and non-survivors` group..... | 57 |

LISTA DE TABELAS

Artigo Original

| | |
|--|----|
| Table 1: Main characteristics of the patients included in the study` | 43 |
| Table 2: Correlation between cytokines and laboratory data (CRP and lymphocytes), lung injury (PaO ₂ /FiO ₂) and severity score (SOFA)..... | 46 |
| Table S1: Correlation between cytokines and chemokines measured in mini-BAL and clinical/ laboratory data on days 1-2..... | 58 |
| Table S2: Correlation between cytokines and chemokines measured in plasma and clinical/laboratory data on days 1-2..... | 59 |
| Table S3: Correlation between cytokines and chemokines measured in mini-BAL and clinical/laboratory data on days 5-8..... | 60 |
| Table S4: Correlation between cytokines and chemokines measured in plasma and clinical/laboratory data on days 5-8..... | 61 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------------------------|---|
| ACE2 | Enzima conversora de angiotensina 2 |
| APACHE II | Acute Physiology and Health Evaluation - II |
| BAL | Lavado broncoalveolar |
| CDC | <i>Disease Control and Prevention</i> |
| COEP | Comitê de Ética em Pesquisa |
| COVID-19 | Doença coronavírus 2019 |
| DM | Diabetes Mellitus |
| DPOC | Doença pulmonar obstrutiva crônica |
| FoxP3 | Fator de transcrição nuclear P3 |
| G-CSF | Fator estimulador de colônias de granulócitos |
| HAS | Hipertensão arterial sistêmica |
| g | Gramas |
| HC- UFMG | Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais |
| IECA-2 | Inibidor da enzima conversora de angiotensina II |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleucina |
| IRF3 | Fator regulador de interferon 3 |
| ISGs | Genes estimulados por interferon |
| JAK | Janus quinase |
| kDA | Quilodalton |
| kg | Quilograma |
| µl | Microlitro |
| m | Metro |
| min | Minuto |
| mini-BAL | Mini-lavado broncoalveolar |
| mg | Miligrama |
| mg/dl | Miligrama por decilitro |
| mg/l | Miligrama por litro |
| ml | Mililitro |
| mmol/l | Milimol por litro |
| NETs | Armadilhas extracelulares de neutrófilos |
| PaO ₂ /FiO ₂ | Pressão parcial de oxigênio arterial/Fração inspirada de oxigênio |
| PCR | Proteína C Reativa |

| | |
|-------------|--|
| PD1 | Programmed-death 1 |
| RIG-1 | Gene induzível pelo ácido retinóico I |
| pg/mm | Picograma por mililitro |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| RT-PCR | Reverse transcription polymerase chain reaction |
| s | Segundos |
| SARS-CoV -2 | Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 |
| SDRA | Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo |
| SOFA | Sequential Organ Failure Assessment |
| SpO2 | Saturação periférica de oxigênio |
| STAT | transdutor de sinal e ativador de transcrição |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| TCLE | Termo de consentimento livre e esclarecido |
| TMPRSS2 | Protease transmembrana serina 2 |
| TNF | Fator de necrose tumoral |
| Tregs | T reguladoras |
| TRIM25 | Proteína 25 contendo motivo tripartite |
| UFMG | Universidade Federal de Minas Gerais |
| UTI | Unidade de Terapia Intensiva |
| VM | Ventilação mecânica |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 2. RACIONAL TEÓRICO..... | 19 |
| 2.1 CITOCINAS..... | 22 |
| 2.1.1 Citocinas pró-inflamatórias..... | 22 |
| 2.1.2 Citocina anti-inflamatória..... | 24 |
| 2.2 QUIMIOCINAS..... | 25 |
| 2.2.1 Quimiocinas inflamatórias e homeostáticas..... | 26 |
| 2.3 DESREGULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NA COVID-19..... | 26 |
| 2.3.1 Sítio sistêmico..... | 27 |
| 2.3.2 Sítio Pulmonar..... | 29 |
| 2.4 PERFIL INFLAMATÓRIO SISTÊMICO VERSUS PULMONAR..... | 30 |
| 3. JUSTIFICATIVA..... | 31 |
| 4. OBJETIVOS..... | 32 |
| 4.1 OBJETIVO GERAL..... | 32 |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 32 |
| 5 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 33 |
| 5.1 DESENHO DO ESTUDO E LOCAL DE REALIZAÇÃO..... | 33 |
| 5.2 SELEÇÃO DOS SUJEITOS DA PESQUISA..... | 33 |
| 5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO..... | 33 |
| 5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO..... | 33 |
| 5.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS..... | 34 |
| 5.6 COLETA DOS DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E TOMOGRÁFICOS..... | 34 |
| 5.7 COLETA E PROCESSAMENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO..... | 35 |
| 5.8 DOSAGEM DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS..... | 36 |
| 5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 37 |
| 6 RESULTADOS..... | 38 |
| 6.1 ARTIGO ORIGINAL..... | 39 |
| CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS..... | 65 |
| REFERÊNCIAS..... | 66 |
| ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP..... | 76 |
| APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO/Participante..... | 86 |
| APÊNDICE 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO/Responsável..... | 89 |

APRESENTAÇÃO DO AUTOR

Meu nome é Luciana Santiago, graduada em Fisioterapia pela Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Especialista em Fisioterapia Respiratória pela Universidade Federal de Minas Gerais; Especialista Profissional em Fisioterapia em Terapia Intensiva, com área de atuação no adulto, conferido pela Associação Brasileira de Fisioterapia Cardiorrespiratória e Fisioterapia em Terapia Intensiva – ASSOBRAFIR; Especialista em Preceptoria em Saúde pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Fisioterapeuta Respiratória do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais e do Hospital Metropolitano Odilon Behrens. Minha jornada na pesquisa em imunologia começou nos primeiros anos do curso de graduação como aluna de Iniciação Científica no Laboratório de Imunoparasitologia – IMPAR. Nessa época, meus primeiros professores, Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli e Dra. Leda Quercia Vieira, e colegas de pesquisas, o hoje Prof. Dr. Helton da Costa Santiago e a Dra. Carolina Ferreira de Oliveira, foram meus suportes primordiais na pesquisa sobre quimiocinas na *Leishmania major*. Posteriormente, ao ingressar no corpo dos profissionais do Hospital das Clínicas da UFMG, conheci de forma mais próxima o Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Júnior, o qual foi meu chefe na Unidade de Terapia Intensiva adulto. Ao surgir a pandemia da doença COVID-19, apareceu também a oportunidade de estudar citocinas e SARS-CoV-2. Consequente à iniciativa da Dra. Cecília Gómez Ravetti e da Dra. Paula Frizera Vassallo ao escreverem um projeto inicial de pesquisa sobre a COVID-19, possibilitou acréscimo, a esse projeto, o estudo de imunologia. Neste último, agradeço às minhas incríveis coorientadoras, Dra. Marcela e Dra. Cecília, e aos maravilhosos professores Dr. Vandack e Dr. Helton por me aceitarem com aluna de mestrado.

1. INTRODUÇÃO

Desde o surgimento da doença coronavírus 2019 (COVID-19), causada pelo coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), pesquisadores de vários países do mundo uniram esforços para compreender essa nova condição e orientar seu manejo clínico e prevenção. Em três anos de pandemia, houve mais de 676 milhões de casos de COVID-19 e mais de 6,8 milhões de mortes (Johns Hopkins University - COVID-19 dashboard, 2023).

O sistema respiratório é o principal local de infecção do SARS-CoV-2, sendo o pulmão um local crítico na resposta imune inicial contra esse vírus (Arish, Qian *et al.*, 2023). Uma resposta imune ineficaz pode levar à evolução para a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e à necessidade de ventilação mecânica (VM), condição clínica crítica associada a alta mortalidade na COVID-19 (Grasselli, Greco *et al.*, 2020; Huang, Wang *et al.*, 2020; Yang, Yu *et al.*, 2020; Wu e Yang, 2021). No entanto, já se sabe que a COVID-19 pode evoluir para uma doença sistêmica, com envolvimento de vários tecidos extrapulmonares (Elrobaa e New, 2021; Arish, Qian *et al.*, 2023) e, por conseguinte, a várias disfunções orgânicas. Assim, o estudo imunológico de sítios pulmonares e sistêmicos torna-se importante para um melhor entendimento da COVID-19.

A maior incidência de doenças críticas e fatais em pacientes com COVID-19 foi associada a padrões alterados de citocinas (Galani, Rovina *et al.*, 2021; Hu, Pan *et al.*, 2022). Em um acompanhamento longitudinal, observou-se que os casos moderados tiveram redução dos níveis plasmáticos de citocinas, enquanto os que evoluíram para o estado grave mantiveram altos níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas associadas a monócitos, além de recrutamento e sobrevivência de células T (Lucas, Wong *et al.*, 2020). Casos graves de COVID-19 admitidos em unidade de terapia intensiva (UTI) foram associados a níveis plasmáticos aumentados de interleucina IL-2, IL-7, IL-10, G-SCF, CXCL10, CCL2, CCL3 e TNF quando comparados aos pacientes sem requerimento desses cuidados (Huang, Wang *et al.*, 2020). Além disso, níveis plasmáticos elevados da citocina pró-inflamatória IL-6 demonstrou ser indicador de gravidade de lesão pulmonar (Chen, Zhang *et al.*, 2020) e mortalidade em COVID-19 (Del Valle, Kim-Schulze *et al.*, 2020). Os níveis de citocinas nos pulmões também estão elevados durante a infecção. Análise de transcriptomas de RNAs isolados do lavado broncoalveolar de pacientes com COVID-19 encontrou alta expressão de CCL2, CCL3, CCL4 e CXCL10 quando comparados a doadores saudáveis (Xiong, Liu *et al.*, 2020).

Embora a magnitude da elevação das citocinas plasmáticas na COVID-19 seja menor em comparação com a sepse e a SDRA (Kox, Waalders *et al.*, 2020; Leisman, Ronner *et al.*,

2020; Sinha, Matthay *et al.*, 2020), intervenções direcionadas à inibição dessa resposta podem ser benéficas em pacientes críticos com COVID-19. Por exemplo, foi demonstrado que pacientes críticos tratados com inibidor do receptor de IL-6, tocilizumabe (RECOVERY, 2021), e inibidor da Janus quinase (JAK) 1 e JAK 2, baricitinibe (RECOVERY, 2022), apresentaram menor mortalidade, tornando-se opções terapêuticas de acordo com as Diretrizes de Tratamento da COVID-19 (COVID-19 Treatment Guidelines Panel, 2023).

Relatos recentes apontam para processos inflamatórios distintos nos sítios sistêmico e pulmonar. Diferentes estudos demonstraram que pacientes com COVID-19 que evoluíram a óbito apresentaram menor ativação de células T CD4 e CD8 nos pulmões quando comparados ao sangue periférico (Saris, Reijnders *et al.*, 2021), enquanto as células T reguladoras (Tregs) pulmonares apresentam maior expressão de PD1 e menor expressão de FoxP3 em relação às células Tregs sanguíneas (Goncalves-Pereira, Santiago *et al.*, 2023).

Alguns grupos têm investigado a regulação da resposta inflamatória sistêmica e pulmonar na COVID-19. Pandolfi *et al.* observaram que os níveis pulmonares e periféricos de IL-6 estavam positivamente correlacionados. Entretanto, as amostras não foram coletadas simultaneamente, limitando as conclusões (Pandolfi, Fossali *et al.*, 2020). Por outro lado, Reynolds *et al.* analisaram, amostras de uma coorte que incluiu 13 indivíduos com COVID-19 grave e quatro indivíduos com influenza grave, o lavado broncoalveolar e o plasma e observaram que, de 35 citocinas medidas, apenas CXCL10 apresentou correlação entre as amostras, sugerindo compartimentalização e independência entre esses dois locais (Reynolds, Vazquez Guillamet *et al.*, 2021).

Dessa forma, são necessários mais estudos para entender os mecanismos e características da evolução fatal em pacientes críticos com COVID-19, tanto em sítios pulmonares quanto sistêmicos. A fim de avançar no conhecimento do padrão inflamatório na COVID-19 crítica, este estudo tem como objetivo avaliar o papel modulador de citocinas e quimiocinas no sistema imunológico em sítios pulmonares e sistêmicos de pacientes com COVID-19 grave em ventilação mecânica invasiva, internados em uma unidade de terapia intensiva.

2. RACIONAL TEÓRICO

A doença coronavírus 2019 (COVID-19) surgiu em dezembro de 2019 em Wuhan, na China (Wang, Horby *et al.*, 2020), causada por um novo coronavírus da família *Coronaviridae*, gênero *Betacoronavirus*, subgênero *Sarbecovirus* (Wu, Zhao *et al.*, 2020). Em janeiro de 2020 o seu genoma foi identificado e, então, denominado de coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) (Merad, Blish *et al.*, 2022).

O SARS-CoV-2 é um vírus envelopado com um genoma de fita de RNA simples de sentido positivo (Merad, Blish *et al.*, 2022). A organização genômica do SARS-CoV-2 é composta por quatro proteínas estruturais principais – nucleocapsídeo, membrana, envelope e spike – e 16 proteínas não estruturais que medeiam replicação, infecção e patogênese do vírus (Madden e Diamond, 2022), além das proteínas acessórias que têm atividade na evasão da resposta imune (Redondo, Zaldivar-Lopez *et al.*, 2021; Madden e Diamond, 2022; Merad, Blish *et al.*, 2022).

O SARS-CoV-2 está em constante evolução por meio de mutações aleatórias (COVID-19 Treatment Guidelines Panel, 2023), originando, assim, as variantes do vírus. As variantes Alpha (B.1.1.7), identificadas primeiramente no Reino Unido; Beta (B.1.351), África do Sul; Gamma (P.1), em Manaus – Brasil; Delta (B.1.617.2), na Índia; Epsilon (B.1.427), na Califórnia – Estados Unidos; e Omicron (B.1.1.529), em Londres, foram classificadas de acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) como variantes de preocupação, devido à evidência de aumento da transmissibilidade, da gravidade da doença, maior escape do sistema imune e redução da eficácia da vacinação (CDC, 2023). Já as variantes Epsilon (B.1.429), Eta (B.1.525), Iota (B.1.526), Kappa (B.1.617.1), N/A (B.1.617.3) e Zeta (P.2) foram classificadas como variantes de interesse (CDC, 2023), termo utilizado para variantes importantes que não são totalmente caracterizadas (COVID-19 Treatment Guidelines Panel, 2023). Outro termo criado pelo CDC foi o “variantes sendo monitoradas”, que inclui a variante Mu (B.1.621 e B.1.621.1), devido a atributos e características compartilhadas que podem exigir ação de saúde pública (CDC, 2023).

Para infectar a célula hospedeira, o SARS-CoV-2 utiliza a proteína estrutural spike (Fig.1) (Lamers e Haagmans, 2022). Durante a entrada do vírus na célula, a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) foi identificada como um receptor inicialmente importante, ao qual a proteína spike (S) se liga para entrar na célula através do domínio de ligação ao receptor (Wan, Shang *et al.*, 2020). Após a clivagem proteolítica da spike pela protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2) em subunidades S1 e S2, ocorre a fusão celular mediada pela S2 (Hoffmann,

Kleine-Weber *et al.*, 2020; Jaimes, Millet *et al.*, 2020). Outras proteases também podem clivar a proteína S dando início à entrada do vírus na célula, como a catepsina L (Zhao, Yang *et al.*, 2021), furina (Jaimes, Millet *et al.*, 2020), heparan sulfato (Clausen, Sandoval *et al.*, 2020) e a proteína 78 regulada por glicose (GRP78) (Carlos, Ha *et al.*, 2021).

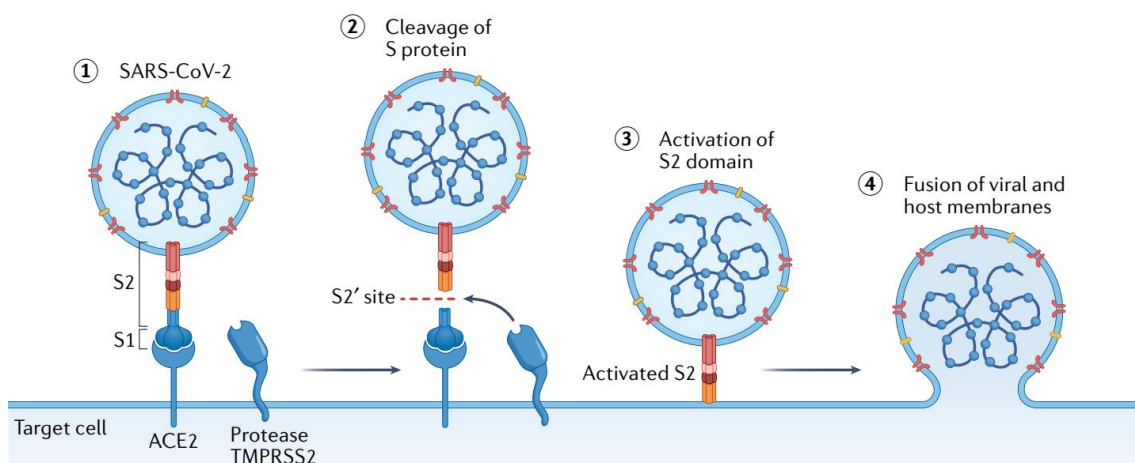


Figura 1: Entrada do SARS-CoV-2 na célula hospedeira. A proteína S se liga ao receptor enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) na célula hospedeira usando o domínio S1 (estágio 1). Isso permite que a TMPRSS2 clive a proteína S (estágio 2), levando à ativação do domínio S2 a fim de permitir a fusão celular (estágio 3). O S2 ativado funde as bicamadas lipídicas viral com a célula hospedeira, resultando na deposição do genoma viral de RNA na célula hospedeira (estágio 4). Abreviações: ACE2, enzima conversora de angiotensina 2; SARS-CoV-2, Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2; TMPRSS2, protease transmembrana serina 2. Fonte: Lamers MM, Haagmans BL. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2022 May;20(5):270-284. doi: 10.1038/s41579-022-00713-0.

Evidências posteriores demonstraram que o SARS-CoV-2 também pode infectar tecidos com baixa (Hikmet, Mear *et al.*, 2020; Gusev, Sarapultsev *et al.*, 2022) ou nenhuma expressão de ACE2, como a medula óssea (Zheng, Yuan *et al.*, 2021). Nesse sentido, outros receptores de membrana foram apontados como via de entrada do SARS-CoV-2, como o CD147 (Wang, Chen *et al.*, 2020), CD209L/L-SIGN (Amraei, Yin *et al.*, 2021), CD209/DC-SIGN (Amraei, Yin *et al.*, 2021), neuropilina-1 (Cantuti-Castelvetri, Ojha *et al.*, 2020; Daly, Simonetti *et al.*, 2020), AXL (Wang, Qiu *et al.*, 2021), dentre outros (Gusev, Sarapultsev *et al.*, 2022). Essa diversidade de receptores torna o SARS-CoV-2 capaz de infectar uma ampla gama de tecidos e órgãos, como o sistema pulmonar (Wiersinga, Rhodes *et al.*, 2020), cardíaco (Liu, Blet *et al.*, 2020; Madjid, Safavi-Naeini *et al.*, 2020), renal (Pei, Zhang *et al.*, 2020; Su, Yang *et al.*, 2020), hepático (Huang, Li *et al.*, 2021; Baldelli, Marjot *et al.*, 2023), gastrointestinal (Chen, Hsu *et al.*, 2022), neurológico (Whittaker, Anson *et al.*, 2020; Bholá, Trisal *et al.*, 2022), tecido adiposo (Saccon, Mousovich-Neto *et al.*, 2022) e medula óssea, como mencionado (Zheng, Yuan *et al.*, 2021).

Após a entrada na célula, o SARS-CoV-2 passa por um período médio de incubação,

variando de cinco a seis dias (Lauer, Grantz *et al.*, 2020; Wu, Kang *et al.*, 2022). No entanto, esse tempo pode variar dependendo da variante do vírus, sendo o mais curto para a Omicron (Wu, Kang *et al.*, 2022).

Os pacientes com COVID-19 podem permanecer assintomáticos ou apresentar uma ampla gama de manifestações clínicas que variam de leve a um estado crítico com falência de múltiplos órgãos (Diretrizes de Tratamento da Doença de Coronavírus 2019, janeiro de 2023). As diretrizes de tratamento da COVID-19 publicada pelo *National Institutes of Health* (NIH) classificou a gravidade da COVID-19 nas seguintes categorias:

- Assintomática ou pré-sintomática: indivíduos com teste positivo para SARS-CoV-2, mas sem sintomas compatíveis com a doença;

- Leve: presença de algum dos sinais e sintomas, mas sem dispnéia ou imagem pulmonar anormal;

- Moderada: evidência de comprometimento respiratório de via aérea inferior na avaliação clínica ou de imagem, com saturação periférica de oxigênio (SpO_2) $\geq 94\%$ em ar ambiente ao nível do mar;

- Grave: presença de $SpO_2 < 94\%$ em ar ambiente ao nível do mar, relação entre a pressão parcial de oxigênio arterial e a fração inspirada de oxigênio (PaO_2/FiO_2) < 300 mmHg, frequência respiratória >30 respirações/min ou infiltrado pulmonar $>50\%$;

- Crítica: presença de insuficiência respiratória, choque séptico e/ou disfunção de múltiplos órgãos.

A progressão para o estado crítico ocorre geralmente em torno de 10 a 12 dias após o início dos sintomas da COVID-19 (COVID-19 Treatment Guidelines Panel, 2023). A probabilidade de evoluir para o estado de maior gravidade e óbito na COVID-19 está associada à idade (Deng, Yin *et al.*, 2020; Palaiodimos, Kokkinidis *et al.*, 2020; Williamson, Walker *et al.*, 2020), sendo a mortalidade maior em paciente com idade acima de 80 anos (Deng, Yin *et al.*, 2020; Williamson, Walker *et al.*, 2020); ao sexo masculino (Deng, Yin *et al.*, 2020; Palaiodimos, Kokkinidis *et al.*, 2020; Williamson, Walker *et al.*, 2020); à obesidade (Deng, Yin *et al.*, 2020; Palaiodimos, Kokkinidis *et al.*, 2020; Merad, Blish *et al.*, 2022), principalmente com o índice de massa corporal > 40 Kg/m² (Williamson, Walker *et al.*, 2020); à presença de hipertensão (Deng, Yin *et al.*, 2020; Merad, Blish *et al.*, 2022), diabetes (Deng, Yin *et al.*, 2020; Williamson, Walker *et al.*, 2020; Merad, Blish *et al.*, 2022), doença respiratória prévia (Deng, Yin *et al.*, 2020; Williamson, Walker *et al.*, 2020), doença renal (Williamson, Walker *et al.*, 2020; Merad, Blish *et al.*, 2022; Singh, Malik *et al.*, 2022), doença cardiovascular (Deng, Yin *et al.*, 2020), doença hepática (Williamson, Walker *et al.*, 2020), doença autoimune

(Williamson, Walker *et al.*, 2020), câncer (Deng, Yin *et al.*, 2020); e a história prévia de transplante (Williamson, Walker *et al.*, 2020) e imunossupressão (Williamson, Walker *et al.*, 2020).

A heterogeneidade da COVID-19 é amplamente determinada pela variabilidade da resposta imune do hospedeiro (Van De Veerdonk, Giamarellos-Bourboulis *et al.*, 2022). As citocinas e quimiocinas liberadas por células do sistema imunológico em resposta a infecções virais respiratórias têm um papel fundamental para que ocorra uma resposta antiviral apropriada (Clementi, Ghosh *et al.*, 2021).

2.1 CITOCINAS

As citocinas são um grupo diverso de pequenas proteínas que são secretadas pelas células com a finalidade de sinalização e comunicação intercelular. Elas possuem atividade autócrina, parácrina e/ou endócrina, e, ao se ligarem aos receptores, podem provocar uma variedade de respostas, dependendo da citocina e da célula-alvo (Tisoncik, Korth *et al.*, 2012).

2.1.1 Citocinas pró-inflamatórias

As primeiras citocinas produzidas em resposta aos vírus são os interferons (IFNs), seguidos pelas citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL)-1, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) (Clementi, Ghosh *et al.*, 2021). No entanto, na infecção pelo vírus SARS-CoV-2, o paradigma da imunidade antiviral, onde as respostas antivirais mediadas por IFNs precedem as pró-inflamatórias, nem sempre é observado. Em pacientes com COVID-19 moderada a grave, citocinas pró-inflamatórias plasmáticas, como TNF, IL-6 e CXCL8, são produzidas antes dos IFNs, permanecendo elevadas por tempo prolongado (Galani, Rovina *et al.*, 2021). Convém ressaltar que na infecção por SARS-CoV-2, os níveis plasmáticos elevados de IL-6 e TNF são apontados como preditores significativos de gravidade e morte por COVID-19 (Del Valle, Kim-Schulze *et al.*, 2020).

Os IFNs são uma família de citocinas que desempenham papel central na imunidade antiviral (Fensterl e sem, 2009). Na ausência de uma resposta de IFN intacta, os mamíferos ficam suscetíveis a infecções virais (Schoggins, 2019) que podem se tornar letais. Existem três famílias distintas de IFN, designadas como Tipo I, Tipo II e Tipo III, que são capazes de induzir programas celulares intrínsecos que aumentam a resistência à infecção. Ao todo, existem 21

IFNs humanos (16 do tipo I, sendo 12 IFN α , o IFN β , o IFN ϵ , o IFN κ e o IFN ω ; 1 tipo II, IFN γ ; e 4 do tipo III, sendo eles: IFN λ 1, IFN λ 2, IFN λ 3 e IFN λ 4) (Walter, 2020).

Os IFNs do tipo I (IFN- α e IFN- β) sinalizam através dos receptores IFNAR1/IFNAR2, os IFNs do tipo II (IFN- γ) sinalizam através de IFN- γ R1/IFN- γ R2 e os IFNs do tipo III sinalizam através do complexo heterodimérico IFNLR1/IL10R2 (Tisoncik, Korth *et al.*, 2012; Schoggins, 2019). A formação do complexo receptor-IFN ativa a cascata de sinalização intracelular mediada pela via JAK-STAT (Janus quinase – transdutor de sinal e ativador de transcrição), especialmente JAK1 e STAT1/2 (Briscoe, Guschin *et al.*, 1996). Como resultado, ocorre a ativação de fatores de transcrição e a indução de genes estimulados por IFN (ISGs) (Schoggins, 2019). A Fig. 2 exemplifica a sinalização dos IFN do tipo I e III.

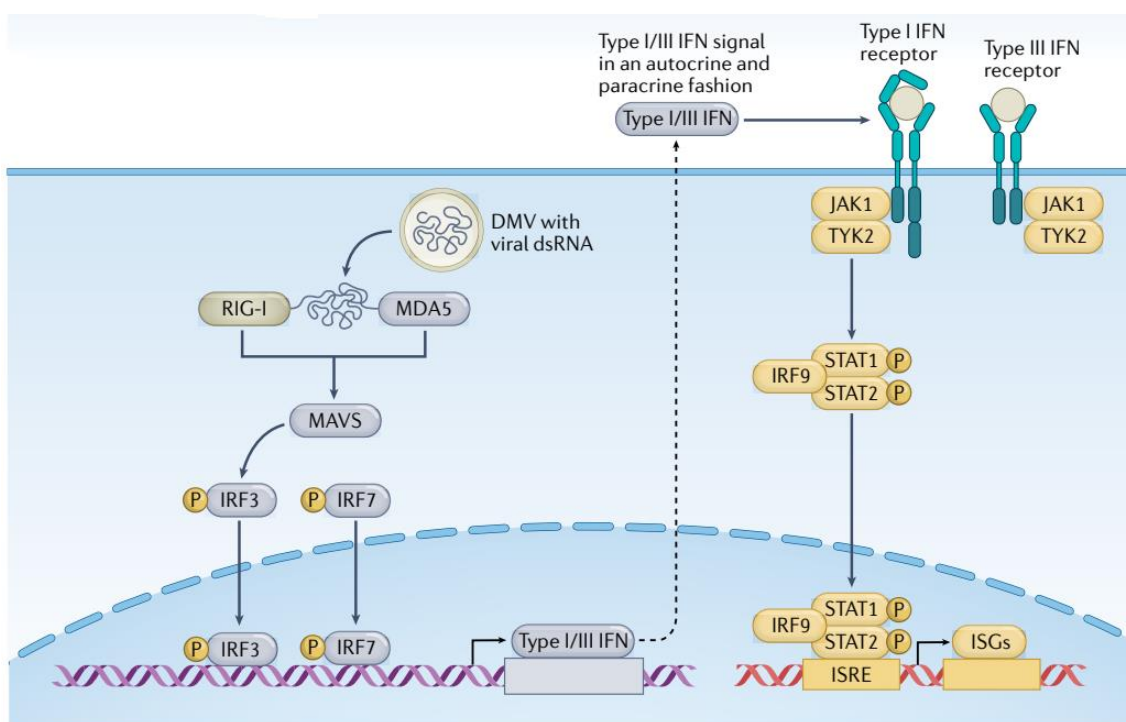


Figura 2: Sinalização dos IFNs do tipo I e III. O RNA viral ativa, vias citoplasmáticas de detecção imune inata, MDA5 ou RIG-I e inicia uma cascata de sinalização através de MAVS que leva a produção de IFNs tipo I e tipo III. Os IFNs agem por meio dos receptores de membrana plasmática e uma cascata de sinalização JAK-STAT1/2, culminando na produção de ISGs, os quais têm funções antivirais. Abreviações: DMV, vesícula de membrana dupla; IFNs, interferons; ISGs, genes estimulados por interferon; IRF, fator regulador de interferon; ISRE, elemento de resposta sensível ao interferon; JAK, janus quinase; MAVS, proteínas de sinalização antiviral mitocondrial; RIG-I, gene induzível pelo ácido retinóico I; STAT, transdutor de sinal e ativador de transcrição. Fonte: Lamers MM, Haagmans BL. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2022 May;20(5):270-284. doi: 10.1038/s41579-022-00713-0.

Os ISGs codificam produtos proteicos com propriedades antivirais (FensterlsemSen, 2009; Tisoncik, Korth *et al.*, 2012; Schoggins, 2019) que desempenham um papel crucial na repressão da replicação viral por meio de vários mecanismos; por exemplo, impedem a entrada

viral na célula e o tráfego viral no núcleo, inibem a replicação viral junto com a transcrição/tradução viral, degradam ácidos nucleicos virais e bloqueiam a montagem de partículas virais, criando um estado antiviral (Schneider, Chevillotte *et al.*, 2014; Schoggins, 2019).

Para escapar da resposta imune, o coronavírus desenvolveu mecanismos que inibem a produção de IFN (Lowery, Sariol *et al.*, 2021). A proteína do nucleocapsídeo é capaz de inibir a indução de IFN do tipo I ao se ligar diretamente à proteína TRIM25, bloqueando a ubiquação do RIG-I (gene induzível pelo ácido retinóico I) (Hu, Li *et al.*, 2020). Além disso, a proteína de membrana é capaz de bloquear a fosforilação e ativação do IRF3 (fator regulador de interferon 3) (Siu, Kok *et al.*, 2009). As proteínas acessórias, como ORF3b, ORF6, ORF7a e ORF8, atuam como antagonistas do IFN do tipo 1 (Redondo, Zaldivar-Lopez *et al.*, 2021).

Sabendo-se do papel crucial do IFN para as respostas antivirais do hospedeiro, estudos têm sido desenhados para análise dessa citocina na resposta desta imunoterapia na COVID-19. No Reino Unido foi realizado um estudo piloto em que um grupo recebeu inalações diárias por 14 dias com IFN β -1 α (n=48), e outro grupo, placebo (n=50), inalações diárias com a mesma formulação, apenas sem a substância ativa IFN β -1 α . Os pacientes que receberam IFN β -1 α inalado tiveram maiores chances de melhora clínica (odds ratio 2,32; IC 95% 1,07 – 5,04; $P=0,033$) no dia 15 ou 16, avaliados pela Escala Ordinal de Melhoria Clínica da Organização Mundial de Saúde, e eram mais propensos a se recuperar durante o tratamento (taxa de risco 2,19; IC 95% 1,03 – 4,69; $P=0,043$) (Monk, Marsden *et al.*, 2021). E, em uma série de casos com cinco pacientes imunossuprimidos com cargas virais altas persistentes e quadro clínico grave com complicações infecciosas secundárias, a administração de IFN γ adjuvante, 100 μ g por via subcutânea, três vezes por semana, mostrou uma rápida diminuição da carga viral com conversão de cultura viral de positiva para negativa analisadas por PCR e ausência de sinais subsequentes de hiperinflamação em quatro pacientes (Van Laarhoven, Kurver *et al.*, 2021).

2.1.2 Citocina anti-inflamatória

A citocina IL-10 é classificada como anti-inflamatória, e uma produção inadequada dela pode levar a uma inflamação descontrolada em infecções virais. Em pacientes críticos com COVID-19 que não sobreviveram, foi observada uma produção deficiente de IL-10 por células T reguladoras (Tregs) mensurada na secreção pulmonar, comparados aos que sobreviveram (Goncalves-Pereira, Santiago *et al.*, 2023). Em contraste, a produção de IL-10 por Tregs plasmáticas foi maior em pacientes que evoluíram ao óbito (Goncalves-Pereira, Santiago *et al.*,

2023), dado coerente com outros achados da literatura que indicam que os níveis plasmáticos de IL-10 são maiores em pacientes graves em comparação com pacientes não graves (Chang, Bai *et al.*, 2022). Em uma revisão sistemática com metanálise, que incluiu 77 artigos e analisou 13.986 pacientes, os níveis plasmáticos de IL-10, dentre outras citocinas, foram mais elevados em casos graves de COVID-19 (Hu, Pan *et al.*, 2022). Especula-se que o aumento dos níveis de IL-10 no plasma de pacientes graves pode ser uma tentativa de regulação da resposta inflamatória descontrolada. De fato, a IL-10 parece ter um papel protetor, pois, enquanto uma produção inadequada pulmonar de IL-10 pode culminar no óbito (Goncalves-Pereira, Santiago *et al.*, 2023), níveis plasmáticos aumentados de IL-10 estão associados a pacientes que se recuperaram da COVID-19 sem sequelas (Queiroz, Neves *et al.*, 2022).

Recentes avanços de investigação sugerem que a IL-10 desempenha um papel crucial na patogênese da COVID-19 devido à sua natureza anti-inflamatória. Isso significa que a IL-10 pode ser uma ferramenta eficaz para atenuar a resposta inflamatória, especialmente em casos em que os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β , IL-1 α e TNF são altos. Além disso, uma deficiência específica no compartimento imunomodulador está relacionada à inflamação pulmonar e sistêmica anormal (Balzanelli, Distratis *et al.*, 2022). Portanto, a IL-10 é apontada como uma citocina que desempenha um papel crucial na adequada resolução da COVID-19 (Hu, Pan *et al.*, 2022).

2.2 QUIMIOCINAS

As quimiocinas, ou citocinas quimiotáticas, constituem uma grande família de pequenas citocinas que possuem baixo peso molecular, variando de 7 a 15kDa (Palomino e Marti, 2015). Suas atividades biológicas foram mais claramente definidas nos leucócitos, onde as quimiocinas coordenam o desenvolvimento, a diferenciação, a distribuição anatômica, o tráfego e as funções efetoras e, assim, regulam as respostas imunes inatas e adaptativas (Murphy, Baggiolini *et al.*, 2000).

Algumas quimiocinas são consideradas pró-inflamatórias e sua liberação pode ser induzida durante uma resposta imune no local da infecção, enquanto outras são consideradas homeostáticas e estão envolvidas no controle da migração celular durante o desenvolvimento ou manutenção tecidual (Palomino e Marti, 2015).

As quimiocinas são classificadas em quatro subfamílias com base no arranjo dos dois resíduos de cisteína N-terminal: CC, CXC, CX3C e XC (Zlotnik e Yoshie, 2012). As duas principais subfamílias são a CC, em que as cisteínas são diretamente justapostas, e a CXC, que

possui um único aminoácido variável entre as cisteínas. Na subfamília CX3C há três aminoácidos entre as duas cisteínas, enquanto na XC não há a primeira e a terceira cisteínas do motivo N-terminal (Hughes e Nibbs, 2018). Já seus receptores são denominados de acordo com suas subfamílias. Por exemplo, os nomes dos receptores das CC e CXC consistem na raízes CCR e CXCR, respectivamente, seguidos por um número (Murphy, Baggiolini *et al.*, 2000).

As quimiocinas CC estimulam principalmente monócitos, mas também agem quimiotaticamente em basófilos, eosinófilos, linfócitos T e células natural killer (NK), enquanto as CXC estimulam principalmente a quimiotaxia de neutrófilos (Palomino e Marti, 2015).

2.2.1 Quimiocinas inflamatórias e homeostáticas

De forma geral, as quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL13, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8 e CXCL10 são classificadas como inflamatórias, pois sua liberação é induzida durante respostas imunológicas inflamatórias no local da infecção, ao passo que as CCL18, CCL19, CCL21, CCL25, CCL27, CXCL12 e CXCL13 são classificadas como homeostáticas, uma vez que atuam na migração celular durante o desenvolvimento ou reparo do tecido (Le, Zhou *et al.*, 2004).

Em uma infecção respiratória viral, as quimiocinas estimulam a migração e o recrutamento de células imunes; assim as quimiocinas pró-inflamatórias têm um papel importante na depuração viral em infecções respiratórias virais, pois estimulam a migração e o recrutamento de células imunes para o local da infecção (Clementi, Ghosh *et al.*, 2021). No entanto, uma produção excessiva de quimiocinas pró-inflamatórias pode contribuir para a hiperinflamação pulmonar observada em pacientes com COVID-19 grave (Zaid, Dore *et al.*, 2021). Esse fato nos ajuda a compreender em parte o resultado de um estudo realizado na França, que demonstrou que maiores concentrações alveolares e plasmáticas de CXCL10 foi independentemente associado a um número maior de dias em ventilação mecânica na infecção por SARS-CoV-2 (Blot, Jacquier *et al.*, 2020).

2.3 DESREGULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NA COVID-19

A desregulação da resposta imune durante uma infecção viral pode resultar em maior infiltração de células inflamatórias, aumento da atividade celular com níveis elevados de citocinas e quimiocinas e uma inadequada depuração viral. Essa resposta inadequada pode ser responsável por lesões teciduais e por complicações da doença (Clementi, Ghosh *et al.*, 2021).

2.3.1 Sítio sistêmico

Tem-se observado que as manifestações graves da COVID-19 são diretamente mediadas por uma resposta imune inadequada, a qual culmina na SDR e em outras disfunções orgânicas. Isso ocorre devido a uma resposta retardada ou diminuída do IFN do tipo I plasmático à regulação positiva sustentada de citocinas pró-inflamatórias plasmáticas e ao atraso na mudança da resposta imune inata para a adaptativa (Sette e Crotty, 2021).

O sistema imunológico inato tem sido apontado como um defensor crítico contra o SARS-CoV-2 (Li, Wang *et al.*, 2022). Esse sistema funciona como a primeira linha de defesa do hospedeiro contra o SARS-CoV-2, limitando a entrada, tradução, replicação e montagem viral, identificando e removendo células infectadas, além de coordenar o desenvolvimento da imunidade adaptativa (Diamond e Kanneganti, 2022).

A COVID-19 leve tem sido associada a células do sistema imune inato com uma assinatura genética robusta estimulada por interferon, mensuradas no plasma nos primeiros dias de infecção, o que não ocorre na COVID-19 grave (Hadjadj, Yatim *et al.*, 2020; Schulte-Schrepping, Reusch *et al.*, 2020).

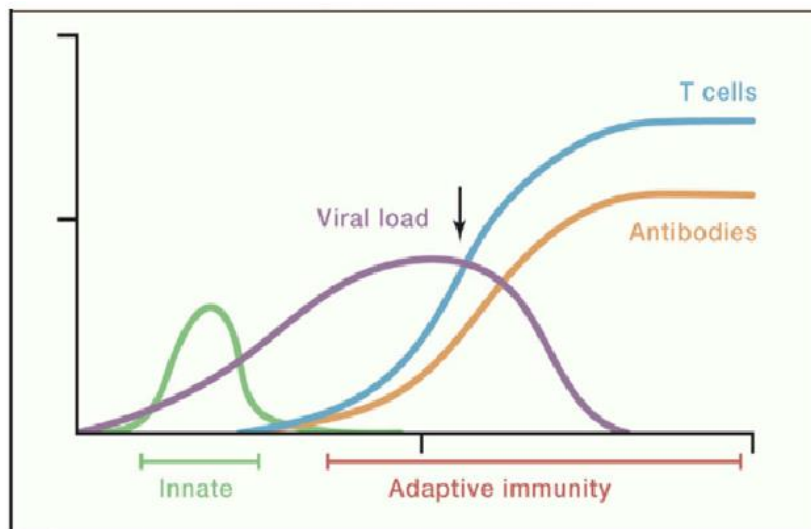
Quando comparados pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 com pacientes infectados pelo Influenza, os primeiros apresentam uma indução plasmática prejudicada de IFNs do tipo I e IFN- λ . Também, os pacientes com COVID-19 expressaram outras citocinas pró-inflamatórias de forma robusta, como TNF, IL-6, IL-7, IFN- γ , CCL3 e CXCL8 – estas citocinas mantiveram-se em altas concentrações por pelo menos 25 dias em um estudo que comparou 32 pacientes com COVID-19 com 16 pacientes com gripe que evoluiu para pneumonia, ambos internados (Galani, Rovina *et al.*, 2021).

Lucas et al demonstraram que pacientes com COVID-19 grave tiveram persistência de níveis elevados de citocinas plasmáticas pró-inflamatórias do sistema imune inato e adaptativo após o décimo dia, em comparação com aqueles que apresentaram formas moderadas da doença. Após esse período, os pacientes com COVID-19 grave mantiveram produção elevada de citocinas pro-inflamatórias do sistema inato, como IFN- α , IFN- λ , IL-1 β , IL-12 e IL-18, e também IFN- γ , IL-5 e IL-13 do sistema adaptativo, enquanto houve redução dessas citocinas nos pacientes com COVID-19 moderada. Esses achados indicam uma diferença na expressão de marcadores inflamatórios plasmáticos ao longo da progressão da doença entre pacientes moderados e graves de COVID-19 (Lucas, Wong *et al.*, 2020).

A desregulação da resposta inflamatória na apresentação grave da COVID-19 pode ocorrer devido ao atraso na mudança da resposta inata para a adaptativa, que é caracterizada

por uma resposta inata exuberante na fase tardia da doença, resultando em imunopatologia significativa (Lowery, Sariol *et al.*, 2021; Sette e Crotty, 2021) (Fig.3).

A) Infecção por COVID-19 em pacientes não hospitalizados



B) Infecção por COVID-19 grave ou fatal, pacientes hospitalizados

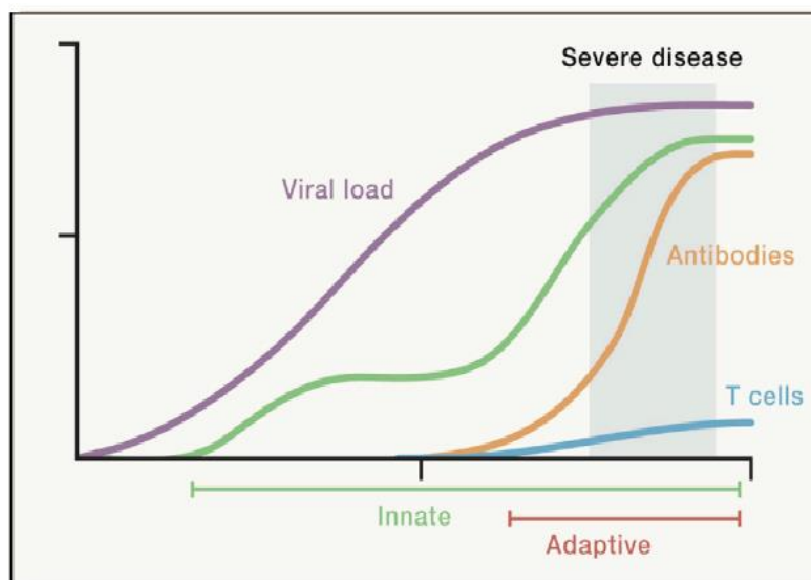


Figura 3: Um modelo integrado da resposta imune e a gravidade na COVID-19. A linha "imunidade inata" refere-se especificamente ao pico cinético de citocinas inatas e quimiocinas detectáveis no sangue; respostas imunes inatas ocorrem localmente durante o curso de uma infecção. "Células T" refere-se a células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas do vírus. "Anticorpos" refere-se a anticorpos neutralizantes específicos do vírus. A seta indica um ponto no tempo com diferenças importantes na presença ou ausência de respostas de células T e na magnitude da carga viral, comparando (A) e (B). O período de doença clínica grave de COVID-19 está sombreado em cinza em (B). Fonte: Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*. 2021 Feb 18;184(4):861-880. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.007.

2.3.2 Sítio Pulmonar

No estudo do sítio pulmonar, tem-se relatado uma expressão maior das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4 e CXCL10 em pacientes com COVID-19 em comparação com controles saudáveis, através de análises transcriptômicas (Xiong, Liu *et al.*, 2020). Assim, umas das explicações para a hiperinflamação dos pulmões de pacientes com COVID-19 grave tem sido a produção excessiva de quimiocinas nos pulmões (Zaid, Dore *et al.*, 2021).

Em pacientes com COVID-19 crítico há um aumento na expressão de CCL2 e CCL3 em macrófagos, juntamente com o receptor CCR1 quando comparado com a COVID-19 moderada (Chua, Lukassen *et al.*, 2020). A ligação de CCL2 ou CCL3 a CCR1, CCR2 ou CCR5 pode induzir o recrutamento de monócitos para o parênquima pulmonar com subsequente diferenciação em macrófagos inflamatórios. Isso, por sua vez, pode levar ao recrutamento e ativação consecutivos de células imunes adicionais, e que, se não devidamente regulado, pode provocar danos epiteliais (Chua, Lukassen *et al.*, 2020). A presença de linfócitos T (Grant, Morales-Nebreda *et al.*, 2021; Saris, Reijnders *et al.*, 2021) e de neutrófilos (Liao, Liu *et al.*, 2020; Zaid, Dore *et al.*, 2021; Arifa, Goncalves-Pereira *et al.*, 2023) nos pulmões também tem sido observada, assim como a prevalência das quimiocinas CC e CXC que estão associadas a influxo de linfócitos e neutrófilos, respectivamente (Zaid, Dore *et al.*, 2021).

O perfil transcriptômico em massa e de célula única, realizado nas primeiras 48 horas de intubação, observou um enriquecimento de linfócitos T CD4+ e CD8+, além de monócitos no espaço alveolar em pacientes com pneumonia por SARS-CoV-2 em relação à pneumonia secundária a outros patógenos. As células T produzem IFN γ , o qual ativa macrófagos alveolares, que, por sua vez, produzem citocinas inflamatórias e promovem ainda mais a ativação dos linfócitos T (Grant, Morales-Nebreda *et al.*, 2021).

As células T CD4+ têm a capacidade de se diferenciar em uma variedade de tipos de células auxiliares e efectoras, com capacidade de instruir as células B, ajudar as células T CD8+, recrutar células inatas e facilitar o reparo tecidual. As células T CD4+ específicas de vírus comumente se diferenciam em células Th1, que têm atividades antivirais através da produção de IFN γ , e citocinas relacionadas, enquanto, as células T CD8+ são críticas para a eliminação de muitas infecções virais, devido à sua capacidade de identificar e matar células infectadas (Sette e Crotty, 2021).

Já os neutrófilos são células imunes que fagocitam partículas virais e corpos apoptóticos de células moribundas que contêm partículas virais e intermediários de replicação. Os neutrófilos liberam grânulos contendo enzimas citotóxicas e espécies reativas de oxigênio

(ROS) para inativar ou eliminar os patógenos, incluindo vírus. Além disso, os neutrófilos ativados formam e liberam armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), compostas de cromatina descondensada e histonas, que incapacitam biofísicamente os vírus e evitam a disseminação viral (Clementi, Ghosh *et al.*, 2021).

A quimiocina-chave, que atua como um mediador do tráfico de neutrófilos, é a CXCL8 (Khalil, Elemam *et al.*, 2021). Os neutrófilos têm um papel importante no sítio pulmonar, e a redução dessas células está relacionada a uma maior mortalidade em pacientes maiores de 60 anos com COVID-19 grave (Arifa, Goncalves-Pereira *et al.*, 2023). No entanto, o excesso de neutrófilos está associado a uma liberação excessiva de NETs no parênquima pulmonar, o que pode causar danos no sistema respiratório de pacientes com COVID-19 (Veras, Pontelli *et al.*, 2020).

2.4 PERFIL INFLAMATÓRIO SISTÊMICO *VERSUS* PULMONAR

Numa revisão sobre resposta imune viral descrita em 2012, os autores descrevem que aparentemente o sangue periférico não reflete uma imagem precisa do perfil de citocinas pulmonares, local inicial da infecção viral (Tisoncik, Korth *et al.*, 2012). Nos últimos três anos, alguns pesquisadores procuraram entender melhor o perfil inflamatório pulmonar e sistêmico na COVID-19. Num estudo sobre a inflamação pulmonar e sua relação com a resposta inflamatória sistêmica, foram comparados os níveis de IL-6 e PCR. Somente a relação dos níveis IL-6 plasmática e IL-6 do BAL mostrou uma correlação direta ($r = 0,53$, $p < 0,01$) (Pandolfi, Fossali *et al.*, 2020).

Em outro estudo, uma coorte combinada de 13 indivíduos com COVID-19 grave e 4 indivíduos com influenza grave, CXCL10 foi a única dentre 35 citocinas mensuradas cujos níveis se correlacionaram significativamente entre o sangue periférico e o lavado broncoalveolar (Reynolds, Vazquez Guillamet *et al.*, 2021). Em estudo marroquino, com 45 pacientes com COVID-19 grave incluídos, foi observado que mediadores inflamatórios nos pulmões diferem daqueles detectados no sangue (Zaid, Dore *et al.*, 2021).

Em suma, esses estudos com COVID-19 citados acima começaram a apontar para um possível perfil de resposta inflamatória diferente entre os sítios pulmonar e sistêmico. No entanto, mais pesquisas são necessárias para elucidar melhor como se comporta a resposta imune nesses dois locais.

3. JUSTIFICATIVA

A evolução da COVID-19 para um estado crítico e fatal tem sido associada a padrões alterados de citocinas. Relatos recentes apontam para processos inflamatórios distintos nos sítios sistêmico e pulmonar, mas estudos que comparam citocinas nesses dois sítios ainda são escassos. Além disso, faltam estudos para elucidar eventuais diferenças no comportamento das principais citocinas entre pacientes com COVID-19 gravemente enfermos que se recuperam e aqueles que falacem, considerando os territórios pulmonar e sistêmico.

Assim, para melhor elucidar o padrão inflamatório na COVID-19 crítica, desenhamos um estudo para analisar o papel modulador de citocinas e quimiocinas no sistema imunológico em ambos os sítios, pulmonar e sistêmico, de pacientes com COVID-19 grave, em ventilação mecânica invasiva, internados em unidade de terapia intensiva. Adicionalmente, avaliamos a associação e correlação do perfil dessas moléculas com características clínicas e laboratoriais desses pacientes.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o perfil das citocinas e quimiocinas pulmonares e sistêmicas em pacientes adultos com infecção pelo SARS-CoV-2 internados em uma unidade de terapia intensiva.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1. Descrever a casuística dos pacientes incluídos no estudo, utilizando dados demográficos e clínicos.

4.2.2. Verificar se existe correlação entre as citocinas e quimiocinas mensuradas no mini-lavado broncoalveolar (mini-BAL) e no sangue periférico.

4.2.3. Verificar se as citocinas/quimiocinas mensuradas no mini-BAL e no sangue periférico têm correlação e associação com dados clínicos/laboratoriais.

4.2.3. Analisar se há diferença entre as citocinas e quimiocinas mensuradas no mini-BAL e no sangue periférico entre o grupo que sobreviveu comparado ao que não sobreviveu durante internação.

4.2.4. Analisar as citocinas e quimiocinas encontradas no mini-BAL e no sangue periférico em relação à capacidade de oxigenação pulmonar medida através da relação PaO_2/FiO_2 (pressão parcial de oxigênio dissolvida no sangue arterial/fração inspirada de oxigênio).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DESENHO DO ESTUDO E LOCAL DE REALIZAÇÃO

Trata-se de estudo de coorte prospectivo, realizado na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de Adultos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG). O HC – UFMG é um hospital universitário, público, geral, de grande porte, integrado 100% ao Sistema Único de Saúde (SUS), com 504 leitos, referência em atendimento de alta complexidade no estado de Minas Gerais, localizado na cidade de Belo Horizonte. A UTI de adultos é uma unidade mista, com capacidade instalada de 18 leitos, referência para o atendimento de pacientes criticamente enfermos com infecção por SARS-CoV-2.

5.2 SELEÇÃO DOS SUJEITOS DA PESQUISA

Entre maio de 2020 e abril de 2021, pacientes criticamente enfermos admitidos na UTI adulto do HC-UFMG foram avaliados para elegibilidade neste estudo, seguindo os critérios abaixo.

5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Adulto, com 18 anos ou mais;
- Infecção confirmada por SARS-CoV-2 por RT-PCR;
- Insuficiência respiratória com requerimento de assistência ventilatória mecânica invasiva;
- Ter o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) assinado pelo próprio paciente ou pelo representante legal.

5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes moribundos (previsão de óbito nas próximas 24 horas);
- Paciente que foram vacinados contra SARS-CoV-2
- Pacientes em que o mini-BAL não pode ser coletado dentro dos dois primeiros dias (D1-2) ou entre o quinto e o oitavo dia (D5-8) após a intubação.

Os pacientes foram acompanhados até o desfecho (óbito ou alta hospitalar) e

classificados, para fins de análise estatística, em dois grupos: os que sobreviveram e os que não sobreviveram durante a internação hospitalar.

5.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi conduzido em conformidade com os princípios da Declaração de Helsinque e as Diretrizes e Normas Reguladoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde – CNS) e foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), CAAE: 30437020.9.0000.5149 (ANEXO A).

Esta pesquisa não interferiu na assistência dos pacientes. A decisão sobre estratégias propedêuticas e terapêuticas específicas seguiu exclusivamente determinações da equipe assistencial responsável pelos pacientes durante a estada na UTI, seguindo protocolos clínicos institucionais.

A confidencialidade dos dados dos participantes foi assegurada durante toda a pesquisa. Os dados gerados pelo estudo estão disponíveis para inspeção, mediante solicitação, para representantes das agências reguladoras, autoridades nacionais e locais de saúde e CONEP.

Os pesquisadores obtiveram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) por escrito de todos os sujeitos da pesquisa, assinados por eles próprios ou por um responsável legal, quando os primeiros não estavam em condições de discernimento adequadas ou sedados (Apêndice 1 e Apêndice 2). Os sujeitos da pesquisa ou seus responsáveis legais receberam esclarecimento abrangente a respeito dos objetivos, potenciais riscos e benefícios da participação na pesquisa, tiveram a oportunidade de fazer perguntas em relação ao estudo e tiveram tempo adequado para considerar sua decisão de participar ou não da pesquisa. O TCLE foi assinado e datado em duas vias, uma via do termo foi entregue ao sujeito da pesquisa ou seu responsável legal e a outra via foi arquivada pela equipe de pesquisa.

5.6 COLETA DOS DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E TOMOGRÁFICOS

Os dados demográficos e clínicos foram coletados em prontuários eletrônicos MVPEP SIG SS versão 2.8.0 (MVPEP-PRONTUÁRIO ELETRÔNICO DO PACIENTE, [s. d.]) e AGHU versão 6.9.0 (APLICATIVO DE GESTÃO PARA HOSPITAIS UNIVERSITÁRIOS). Os dados dos exames laboratoriais foram coletados no sistema Matrix Net (LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS HC-UFGM, [s. d.]), enquanto os dados das tomografias

computadorizadas de tórax com seus respectivos laudos médicos foram coletados no sistema eletrônico Vivaceconnect (MV SISTEMAS DE MEDICINA DIAGNÓSTICA LTDA). Esses dados foram coletados e transferidos para a plataforma digital REDCap®, que é um *software* de uso gratuito, disponibilizado pela Universidade *Vanderbilt* a instituições interessadas em pesquisa, mediante cadastramento prévio.

As informações coletadas foram realizadas de forma prospectiva e incluíram dados demográficos (idade e sexo); comorbidades: hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes melito (DM), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), asma, doenças cardiovasculares, doença renal crônica dialítica, neoplasias em atividade, história de transplante, obesidade e outras comorbidades; dados clínicos: porcentagem de acometimento pulmonar em vidro fosco observados na tomografia de tórax e a relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$; dados laboratoriais: leucócitos, neutrófilos, linfócitos, plaquetas, proteína C reativa (PCR), lactato, creatinina, bilirrubina; escores de gravidade clínica: escore SOFA, *Sequential Organ Failure Assessment* (Vincent, Moreno *et al.*, 1996) e o escore APACHE-II, *Acute Physiology and Health Evaluation* (Knaus, Draper *et al.*, 1985), além de informações relativas ao uso de antibióticos, de dexametasona, vasopressores e inotrópicos; evolução com lesão renal aguda durante o período de internação; tempo de internação em UTI e estadia hospitalar. Os pacientes foram acompanhados até o óbito ou alta hospitalar.

5.7 COLETA E PROCESSAMENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Amostras de sangue periférico e secreção pulmonar (mini-BAL) foram coletadas no mesmo dia em dois momentos do seguimento dos pacientes:

- Primeira coleta: primeiras 48 horas após a intubação, ou seja, nos dois primeiros dias (D1-2) após instituição de ventilação mecânica;
- Segunda coleta: entre o quinto e o oitavo dia (D5-8) após a intubação.

As amostras foram devidamente acondicionadas e transportadas em temperatura ambiente para o Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, onde foram realizados o processamento inicial e o armazenamento dessas amostras.

Foram coletados 5ml de sangue periférico em tubos coletores a vácuo com heparina em cada amostra. Quando não puderam ser transportadas imediatamente, as amostras de sangue foram mantidas a 4°C até o momento do transporte para o processamento, o qual foi realizado

no mesmo dia da coleta. No processamento, o plasma foi separado por centrifugação utilizando Ficoll Hpaque (SIGMA). O plasma foi recolhido, devidamente identificado e armazenado, em freezer a -80°C , para posterior análise das citocinas e quimiocinas, enquanto as células foram usadas em outros estudos conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa (Arifa, Goncalves-Pereira *et al.*, 2023; Goncalves-Pereira, Santiago *et al.*, 2023).

As amostras de secreção pulmonar foram coletadas através da técnica do mini-lavado broncoalveolar (mini-BAL) (Kollef, Bock *et al.*, 1995) com modificação, usando um volume menor (Erden, Basaranoglu *et al.*, 2003) e um sistema de aspiração traqueal fechado, para se adequar às precauções de transmissão do SARS-CoV-2. Assim, foram instilados 10 ml de soro fisiológico estéril na traqueia/brônquio direito e imediatamente realizada a aspiração e dispensação em um frasco coletor de secreção estéril. O processamento da secreção pulmonar foi realizado dentro de duas horas após a coleta. Para a separação do sobrenadante e das células foi utilizado o método descrito por Pizzichini *et al.* (1996), que consiste em diluir duas vezes a amostra de secreção pulmonar em tampão fosfato salina, pH 7,4 (PBS 1x) contendo 0,1% de Ditiotreitól (LGC Biotecnologia), levar no vortex por 15s, deixar em repouso por 10 min e colocá-la novamente no vortex por 15s (Pizzichini, Pizzichini *et al.*, 1996). Em seguida, as amostras foram diluídas 4x em PBS 1x e submetidas a centrifugação a 200g por 10 min. Por fim, o sobrenadante foi coletado e armazenado, em freezer a -80°C , para posterior análise das citocinas e quimiocinas.

5.8 DOSAGEM DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS

A quantificação dos níveis plasmáticos e no sobrenadante da secreção pulmonar de CCL2, CCL4, CXCL8, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, TNF e IFN- γ foi realizada através do kit Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 17-plex Assay (Bio-Rad) e CCL3, CCL5, CXCL10, através do Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 3-plex Assay (Bio-Rad), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram analisadas através do Bio-Plex™ 200 System (Bio-Rad) utilizando o *software* Bio-Plex Manager™ versão 6.1 (Bio-Rad) no Laboratório Professor Lineu Freire Maia da Faculdade de Medicina da UFMG.

A citocina IL-7 não foi detectável em nenhuma amostra. CCL5 foi detectável em apenas 42% do total das amostras e apenas em 31% do sobrenadante da secreção pulmonar. Assim, essas citocinas foram excluídas das análises devido provável erro na leitura do citômetro.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi utilizado o *software* GraphPad Prisma versão 9.5.0. Os dados foram descritos na forma de proporção para as variáveis categóricas, enquanto para as variáveis contínuas utilizaram-se mediana e primeiro e terceiro quartil (Q1-Q3) devido a sua distribuição não paramétrica. Esse padrão de distribuição foi definido pela análise do padrão visual dos gráficos e pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. As características dos pacientes, variáveis categóricas, foram analisadas através do teste exato de Fisher, enquanto para as variáveis contínuas, pelo teste de Mann-Whitney. Para as análises de correlações utilizou-se o teste não paramétrico de Spearman R. Valores *outliers* foram analisados usando o método de ROUT (Q = 1%) e retirados das análises.

Considerou-se como significativo o valor bicaudal de $p < 0,05$ em todas as análises.

6 RESULTADOS

Os resultados deste estudo serão apresentados no formato de um artigo original a ser submetido para publicação.

Title**Compartmentalized regulation of pulmonary and systemic inflammation in critical COVID-19 patients****Authors**

Luciana Santiago^{1,2,3,4#}, Marcela Helena Gonçalves-Pereira^{3#}, Mariana Sousa Vieira³, Cecilia Gómez Ravetti^{1,2,4}, Paula Frizera Vassallo^{2,4}, Rafael Silva e Castro^{1,4}, Pedro Pires Costa Pimenta^{1,4}, Marcus Vinícius Melo de Andrade^{1,2}, Helton da Costa Santiago^{3#}, Vandack Nobre^{1,2,4#}

Affiliations

¹ Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

² Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

³ Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

⁴ Núcleo Interdisciplinar de Investigação em Medicina Intensiva (NIIMI), Belo Horizonte, MG, Brazil.

#These authors contributed equally to the study.

Correspondence: Helton Santiago, Federal University of Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627. Pampulha, Belo Horizonte. MG. 20270-901. E-mail: heltonsantiago@icb.ufmg.br Vandack Nobre, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Professor Alfredo Balena, 110. Santa Efigênia, Belo Horizonte. MG. Zip code 30130-100. E-mail: vandack@gmail.com

Abbreviations: ARDS, acute respiratory distress syndrome; COVID-19, coronavirus disease 2019; ICU, intensive care unit; mini-BAL, mini-bronchoalveolar lavage; MV, mechanical ventilation; PaO₂/FiO₂, arterial oxygen partial pressure/ fractional inspired oxygen; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; APACHE II, acute physiological assessment, and chronic health evaluation.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; cytokines; chemokines; lung; systemic.

Abstract

Background: The evolution of COVID-19 into a critical and fatal state has been associated with altered patterns of cytokines and chemokines. Recent reports have pointed to distinct inflammatory processes occurring in systemic and pulmonary sites. However, studies comparing the profile of these molecules in these two sites are still scarce. **Objective:** To evaluate the profile of pulmonary and systemic cytokines and chemokines in critically ill COVID-19 patients. **Methods:** Levels of cytokines and chemokines were measured in plasma samples and mini-bronchoalveolar lavage using Luminex multiplex assay of critical COVID-19 patients within 48 hours and 5-8 days after intubation. **Results:** We included 34 patients, 16 survivors and 18 non-survivors, and our findings indicate that distinct inflammatory processes occur in the pulmonary and systemic sites, which seem to be regulated separately. Survivors' patients had higher mini-BAL levels of IFN- γ , IL2, IL4, G-CSF, and CCL4 when compared to non-survivors. Conversely, non-survivors presented higher plasma levels of IL-6, CXCL8, CXCL10, CCL2, and CCL4 than survivors. Furthermore, our findings indicate that higher levels in the mini-BAL of TNF and CXCL8 were associated with better lung oxygen exchange capacity, whereas higher levels in plasma IFN- γ and IL-5 were associated with worse lung function, as measured by the PaO₂/FiO₂ ratio during the early phase of the critical infection. **Conclusion:** These results suggest that a robust and localized inflammatory response in the lungs is protective and associated with survival, whereas a systemic inflammatory response appears to be detrimental and associated with mortality in critically ill patients with COVID-19.

Introduction

Since the emergence of coronavirus disease 2019 (COVID-19), caused by severe respiratory acute syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), researchers from different countries have struggled to understand this new disease and provide guidance for its clinical management. Over the three years since the start of the pandemic began, there have been over 676 million reported cases of COVID-19 and more than 6.8 million deaths worldwide [1].

The pulmonary system is the primary site of SARS-CoV-2, making it a critical player in the initial immune response against this virus [2]. However, COVID-19 is now known to be a systemic disease, with the involvement of multiple extrapulmonary tissues [2, 3]. Thus, studying the immune response in both pulmonary and systemic sites is essential for a better understanding of COVID-19 pathogenesis.

A higher incidence of critical illness and fatality has been associated with altered cytokine patterns in patients with COVID-19 [4, 5]. For example, a longitudinal study demonstrated that while moderate COVID-19 cases had reduced plasma cytokine levels, severe COVID-19 cases maintained high levels of cytokines and chemokines associated with monocytes, T cell recruitment, and survival [6]. Another study found that severe cases admitted to the intensive care unit (ICU) had increased plasma levels of IL-2, IL-7, IL-10, G-CSF, CXCL10, CCL2, CCL3, and TNF when compared to those not in the ICU [7]. Furthermore, elevated plasma levels of cytokine IL-6 are a predictor of lung injury severity [8] and mortality [9] in COVID-19. Additionally, cytokine levels are also elevated in the lungs during SARS-CoV2 infection. For instance, analysis of transcriptomic data in bronchoalveolar lavage of a patient with COVID-19 found high expression of CCL2, CCL3, CCL4, and CXCL10 when compared to healthy donors [10].

Some studies have attempted to understand the regulation of systemic and pulmonary inflammation during COVID-19. One study analyzed the correlation between lung and peripheral inflammation and found a positive correlation in IL-6 levels in both sites [11]. However, a limitation of this study was the lack of paired assessments of cytokines, as lung and blood samples were collected at different time points during the infection, making comparisons difficult [11]. CXCL-10 was also found to be correlated between bronchoalveolar lavage and plasma levels in COVID-19 [12]. On the other hand, a recent report suggests limited correlations between the inflammatory cytokines in these two sites [13]. So, it is still necessary more studies to understand

how local and systemic inflammations are regulated in COVID-19.

In this study, our objective was to assess the cytokine patterns in paired samples obtained from the pulmonary and systemic sites of patients with critical COVID-19 who required invasive mechanical ventilation. To achieve this, we analyzed the levels and correlations of cytokine in mini-bronchoalveolar lavage (mini-BAL) fluid and plasma at two different time points. Additionally, we examined the relationship between cytokine levels from the pulmonary and systemic sites and laboratory and clinical parameters, as well as the association of these proteins with the disease outcome of patients with critical COVID-19.

Results

Characteristics of the study population

We prospectively enrolled 34 severely ill patients with SARS-CoV-2 infection under invasive mechanical ventilation, who were admitted to the intensive care unit (ICU) of the Hospital das Clínicas of the Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, between May 2020 and April 2021. The median age was 58 years and 62% were men. The most common underlying comorbidities were systemic arterial hypertension (16%), diabetes mellitus (12%), and cardiovascular disease (9%). Paired blood samples and mini bronchoalveolar lavage (mini-BAL) were collected at two-time points of the follow-up: the first 48 hours of intubation (D1-2) and days 5-8 (D5-8) after intubation. Patients were followed up until the outcome, i.e. hospital discharge (survivors, n=16) or death (non-survivors, n=18). Patients of the non-survivors` group were older than the survivors (p=0.02) and had a significantly higher number of comorbidities (p<0.05). The main characteristics of the included patients are presented in table 1.

Table 1: Main characteristics of the patients included in the study`

| | Total n=34 | Survivor n=16 | Non-survivor n=18 |
|--|-----------------------|--------------------------|------------------------------|
| Baseline | | | |
| Age - median (Q1-Q3) | 58 (41-70) | 47* (40-61) | 64* (51-74) |
| Gender (M) - no. (%) | 21 | 11 | 10 |
| Symptom days - median (Q1-Q3) | 8 (7-11.3) | 8 (7-13) | 5 (7-11) |
| Days of hospital stay prior to study enrollment - median (Q1-Q3) | 1 (1-5.2) | 1*(1-1) | 3.5*(1-10) |
| SOFA (points)- median (Q1-Q3) | 7.5(5-9) | 7 (4-10) | 8 (6-9) |
| APACHE II (points)- median (Q1-Q3) | 16.5 (13.5-22.3) | 16 (10.5-21.5) | 17.5(15-23.8) |
| Chest CT changes \geq 50% GGO - no. (%) | 12/24 (50) | 6/12 (50) | 6/12 (50) |
| PaO ₂ /FiO ₂ - median (Q1-Q3) | 168 (113-201) | 164.1 (106-225) | 168.7 (113-223) |
| Prone patients - no. (%) | 18 (53) | 9 (56) | 9 (50) |
| Continuous use of immunosuppressants drugs - no. (%) | 3 (9) | 2 (12.5) | 1 (5.6) |
| Comorbidities - no. (%) | | | |
| Systemic arterial hypertension - no. (%) | 27 (79.4) | 10* (62.5) | 17* (94.4) |
| Diabetes mellitus - no. (%) | 16 (47) | 6 (37.5) | 10 (55.5) |
| Diabetes mellitus - no. (%) | 12 (35.3) | 4 (25) | 8 (44.4) |
| COPD - no. (%) | 2 (6) | 2 (12.5) | 2 (11.1) |
| Asthma - no. (%) | 2 (6) | 1 (6.3) | 1 (5.6) |
| Cardiovascular diseases - no. (%) | 9 (26.5) | 2 (12.5) | 7 (38.9) |
| CKD dialytic - no. (%) | 2 (6) | 0 | 2 (11.1) |
| Active neoplasm - no. (%) | 4 (11.8) | 1 (6.3) | 3 (16.7) |
| Transplanted - no. (%) | 1 (2.9) | 1 (6.3) | 0 |
| Obesity: BMI > 30 (weight (Kg) / height (m ²)) - no. (%) | 7 (20.6) | 4(25) | 3 (16.7) |
| Other comorbidities - no. (%) | 8 (23.5) | 2 (12.5) | 6 (33.3) |
| Laboratory characteristics at baseline | | | |
| Leukocyte x 10 ³ /μl - median (Q1-Q3) | 10.5 (7.1-14) | 11.1 (6.7-13.6) | 10.4 (6.6-15.1) |
| Neutrophil x 10 ³ /μl - median (Q1-Q3) | 8.7 (6.6-13) | 8.6 (5.6-12.2) | 8.9 (6.3-14) |
| Lymphocyte x 10 ³ /μl - median (Q1-Q3) | 0.6 (0.4-0.8) | 0.7 (0.6-0.8) | 0.5 (0.2-0.9) |
| Platelet x 10 ³ /μl- median (Q1-Q3) | 189 (145-450) | 199 (155-285) | 183 (123-219) |
| CRP mg/l - median (Q1-Q3) | 180 (69.9-229.5) | 160.2 (57.6-254.4) | 190.4 (141.5-227.7) |
| Lactate mmol/l - median (Q1-Q3) | 1.6 (1.4-4.8) | 1.5 (1.2-2.1) | 1.7 (1.5-2.2) |
| Creatinine mg/dl - median (Q1-Q3) | 1.6 (0.7-2.2) | 1.3 (0.5-6.3) | 1.2 (0.6-6.4) |
| Bilirubin mg/dl - median (Q1-Q3) | 0.6 (0.4-5.7) | 0.5 (0.3-1.8) | 0.6 (0.5-5.7) |
| Nosocomial infection | | | |
| At 1 day of this study - no. (%) | 2 (5.9) | 1 (6.3) | 1 (5.6) |
| At 7 day of this study - no. (%) | 9 (26.5) | 3 (18.7) | 6 (33.3) |
| Follow-up | | | |
| Antibiotic use during the ICU stay - no. (%) | 33 (97) | 16 (100) | 17 (94.4) |
| Use of dexamethasone during hospitalization - no. (%) | 28 (82.4) | 14 (87.5) | 14 (78) |
| Vasopressor or inotropic during hospitalization - no. (%) | 32 (94.1) | 14 (87.5) | 18 (100) |
| AKI during hospitalization - no. (%) | 25 (73.5) | 10 (62.5) | 15 (83.3) |
| Length of ICU stay in days - median (Q1-Q3) | 17 (10.5-33) | 21.5 (11-33) | 16.5 (9-30) |
| Length of hospitalization stay in days - median (Q1-Q3) | 31 (18.8-44.8) | 39** (30.5-52.5) | 22** (13-34) |

Abbreviations: AKI, acute kidney injury; APACHE II, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II; BMI, body mass index; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; CKD, chronic kidney disease; CRP, C-reactive protein; CT, computed tomography; GGO, ground-glass opacity; ICU, intensive care unit; M, male; PaO₂/FiO₂, arterial oxygen partial pressure/ fractional inspired oxygen; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment. The Mann-Whitney test was used to compare continuous variables, and Fisher's Exact test for categorical variables. Statistical significance

is indicated by * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$.

Compartmentalized correlation of cytokines levels between lung and plasma

To better understand the immune response in both pulmonary and systemic sites, we measured the concentration of 18 cytokines and chemokines in plasma and mini-BAL at up to 48 hours after intubation, days 1-2 (D1-2), and around day 7 after intubation, days 5 to 8 (D5-8). It is already established that cytokine levels are upregulated in the lungs [14] and plasma [6, 9, 15] during severe COVID-19. To verify the relationship between these two compartments, we evaluated the correlations of the cytokines within each site and between them. We observed a strong correlation between the levels of several cytokines within each compartment at both time points, suggesting an internal regulation of the inflammatory processes in each site. However, we did not observe any correlation between cytokine levels in the lungs and plasma, suggesting that the cytokines response in the lungs and circulation are independently regulated (Figure 1, Table S1-4).

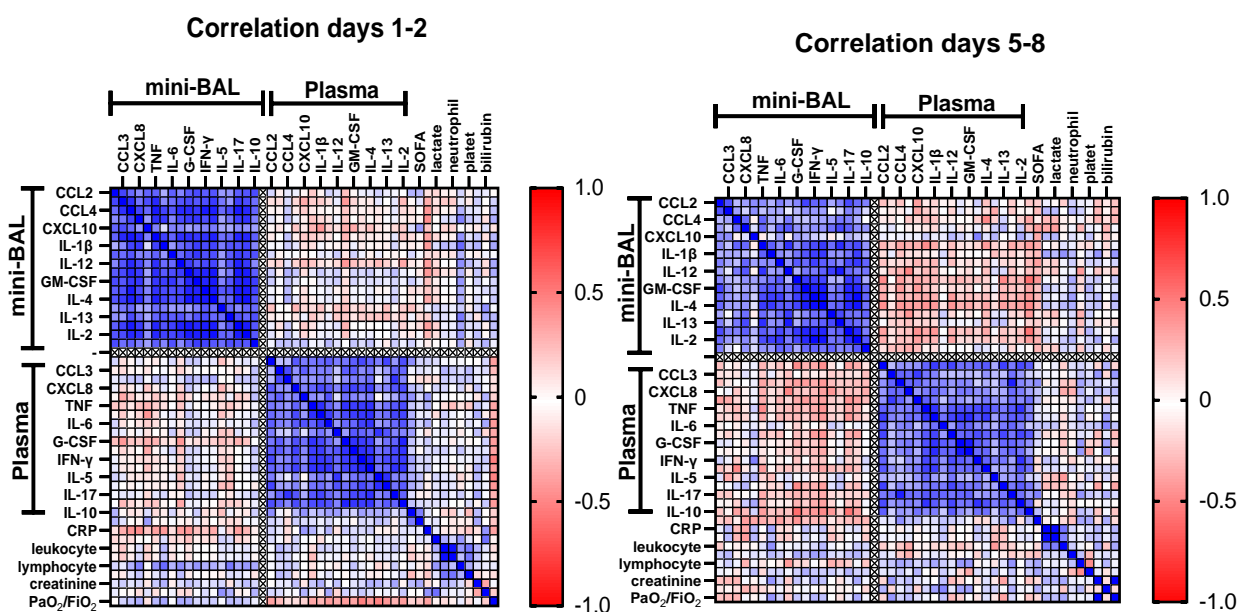
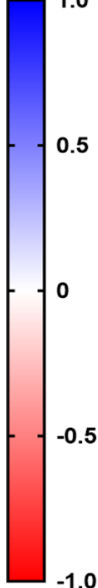


Figure 1: Correlation matrix of cytokine levels and laboratory parameters within and between lung and plasma. Cytokines, chemokines, and laboratory parameters were measured in mini-BAL and peripheral plasma or blood on days 1-2 and days 5-8 after intubation (n=34). Correlations were analyzed using the Spearman correlation coefficient. Each column represents a single cytokine, and the intensity of the color represents the level of correlation (r) between cytokine pairs, blue color indicates a positive correlation while red represents a negative correlation. Abbreviations: CRP, C-reactive protein; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN- γ , interferon γ ; IL, interleukin; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, arterial oxygen partial pressure/ fractional inspired oxygen; TNF, tumor necrosis factor.

We also analyzed whether any cytokines measured in mini-BAL and plasma could be correlated with organic/laboratory markers, such as lactate, C-reactive protein (CRP), platelets, leukocytes, neutrophils, lymphocytes, creatinine, bilirubin, lung injury ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$), and clinical score measured by SOFA at both time points, D1-2, and D5-8 of intubation (Figure 1). We found that, on D1-2, CRP was negatively correlated with pulmonary levels of CCL-4 ($r = -0.41$, $p = 0.03$), CXCL8 ($r = -0.44$, $p = 0.02$), IL-1 β ($r = -0.40$, $p = 0.04$), IL-12 ($r = -0.38$, $p = 0.04$), IL-17 ($r = -0.38$, $p = 0.04$), and G-CSF ($r = -0.41$, $p = 0.03$). Surprisingly, in plasma, CRP only showed a positive correlation with CXCL10 ($r = 0.40$, $p = 0.04$). These results imply that there could be an inverse correlation between pulmonary and systemic inflammation, as suggested by the levels of lung cytokines and CRP. Lymphocytes were also positively correlated with pulmonary levels of CXCL8 ($r = 0.49$, $p = 0.01$), IL-1 β ($r = 0.58$, $p < 0.00$), IL-2 ($r = 0.39$, $p = 0.04$), IL-12 ($r = 0.44$, $p = 0.02$), IL-13 ($r = 0.52$, $p < 0.00$), TNF ($r = 0.42$, $p = 0.03$), and GM-CSF ($r = 0.41$, $p = 0.03$). Interestingly, SOFA score showed a positive correlation only with plasma levels of IL-10 ($r = 0.50$, $p = 0.01$), and $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio showed a negative correlation with several inflammatory cytokines only in plasma, such as IL-2 ($r = -0.39$, $p = 0.04$), IL-4 ($r = -0.40$, $p = 0.03$), IL-5 ($r = -0.49$, $p = 0.01$), IL-6 ($r = -0.39$, $p = 0.04$), IL-13 ($r = -0.41$, $p = 0.03$), IFN- γ ($r = -0.50$, $p = 0.01$), and G-CSF ($r = -0.38$, $p = 0.04$) (Table 2, Table S1 and S2), which also suggests that systemic inflammation seems correlated with worse clinical and laboratory markers than pulmonary inflammation. It is worth noting that these correlations were mostly lost at D5-8, except for lymphocytes that maintained a correlation with lung levels of IL-1 β ($r = 0.42$, $p = 0.03$) (Tables S3 and S4). Lactate, leukocytes, neutrophils, and platelets did not correlate with the production of cytokines studied in both sites in this study.

Mini-BAL D1-2

| | CRP | Lymphocytes | PaO ₂ /FiO ₂ | SOFA |
|--------|---------|-------------|------------------------------------|-------|
| CCL2 | -0.12 | 0.16 | -0.02 | 0.28 |
| CCL3 | -0.32 | 0.09 | 0.17 | 0.11 |
| CCL4 | -0.41 * | 0.30 | 0.23 | -0.02 |
| CXCL8 | -0.44 * | 0.49 * | 0.32 | -0.05 |
| CXCL10 | -0.23 | 0.02 | -0.12 | 0.38 |
| IL-1β | -0.40 * | 0.58 ** | 0.34 | -0.04 |
| IL-2 | -0.28 | 0.39 * | 0.20 | 0.03 |
| IL-4 | -0.33 | 0.31 | 0.20 | 0.00 |
| IL-5 | 0.06 | 0.20 | 0.03 | -0.10 |
| IL-6 | -0.14 | 0.29 | 0.02 | 0.02 |
| IL-10 | -0.07 | 0.33 | 0.07 | 0.04 |
| IL-12 | -0.38 * | 0.44 * | 0.34 | -0.05 |
| IL-13 | -0.19 | 0.52 ** | 0.27 | -0.14 |
| IL-17 | -0.38 * | 0.34 | 0.24 | -0.13 |
| IFN-γ | -0.22 | 0.31 | 0.17 | -0.10 |
| TNF | -0.36 | 0.42 * | 0.27 | -0.04 |
| G-CSF | -0.41 * | 0.29 | 0.32 | -0.08 |
| GM-CSF | -0.25 | 0.41 * | 0.15 | 0.07 |



PLASMA D1-2

| | CRP | Lymphocytes | PaO ₂ /FiO ₂ | SOFA |
|--------|--------|-------------|------------------------------------|--------|
| CCL2 | 0.17 | 0.03 | -0.37 | 0.18 |
| CCL3 | 0.09 | 0.13 | -0.27 | 0.12 |
| CCL4 | -0.15 | 0.21 | -0.13 | -0.14 |
| CXCL8 | -0.02 | 0.16 | -0.13 | 0.19 |
| CXCL10 | 0.40 * | -0.01 | -0.18 | 0.14 |
| IL-1β | 0.08 | 0.01 | -0.29 | 0.07 |
| IL-2 | 0.11 | -0.02 | -0.39 * | 0.14 |
| IL-4 | 0.19 | 0.02 | -0.40 * | 0.13 |
| IL-5 | -0.05 | -0.16 | -0.49 * | 0.24 |
| IL-6 | 0.29 | -0.02 | -0.39 * | 0.15 |
| IL-10 | 0.10 | 0.06 | -0.18 | 0.50 * |
| IL-12 | -0.11 | -0.08 | -0.33 | 0.04 |
| IL-13 | -0.07 | -0.09 | -0.41 * | 0.21 |
| IL-17 | -0.06 | 0.19 | -0.30 | -0.06 |
| IFN-γ | 0.15 | 0.06 | -0.50 * | 0.15 |
| TNF | 0.29 | -0.12 | -0.35 | 0.13 |
| G-CSF | 0.20 | 0.04 | -0.38 * | 0.08 |
| GM-CSF | 0.13 | 0.23 | -0.36 | -0.04 |




Table 2: Correlation table between cytokines and laboratory data (CRP and lymphocytes), lung injury (PaO₂/FiO₂) and severity score (SOFA). Cytokines were measured in mini-BAL and plasma samples on days 1-2 of intubation and were correlated with CPR, lymphocytes, PaO₂/FiO₂ and SOFA. Mini-BAL and plasma cytokine levels were correlated to CRP (mg/l, n = 28), lymphocytes count (10³/μl, n = 28), PaO₂/FiO₂ (mmHg, n = 28), and SOFA (n = 28). Correlations were calculated with Spearman correlation coefficient. Each column represents a single cytokine, and the intensity of the color represents the level of correlation (r), blue color indicates a positive correlation while red represents a negative correlation. Significant correlations are indicated by * P < 0.05 or ** P < 0.01.

Survivors exhibit higher levels of cytokines in the lung, whereas non-survivors, in the blood

We then analyzed whether cytokines/chemokines measured in plasma or lungs could be associated with the clinical evolution of critical COVID-19. Both groups showed generally similar levels of lung chemokines on D1-2, except for CCL4. The survivors` group had a higher production of CCL4 in the mini-BAL on D1-2 (p=0.01) as compared to their non-survivor counterparts. On the other hand, we observed in the plasma of non-survivors a significantly higher production of CXCL10 (p=0.02) on D1-2 and CCL2 (p=0.007), CCL4 (p=0.03) and CXCL8 (p=0.04) on D5-8. We observed no significant difference between the two groups regarding the production of CCL3 in both sites (Figure 2). In contrast, survivors also showed higher levels of IFN-γ (p=0.01), IL-2 (p=0.01), IL-4 (p=0.03), G-CSF (p=0.01), and IL-10 (p=0.02) in mini-BAL on D5-8. On the other hand, non-survivors had higher levels of IL-6 in plasma on both time points, D1-2 (p=0.02) and D5-8 (p=0.04). TNF levels were increased in both the lungs and blood on D1-2 in the survival

group (Figure 3). No significant differences were found between the two groups in the levels of IL-1 β , IL-5, IL-12, IL-13, IL-17, and GM-CSF in either the lungs or blood (Figure S2). These data suggest that non-survivors presented higher levels of inflammatory markers on the plasma, especially at latter times of infection, while survivors showed strong inflammatory signs in the lungs.

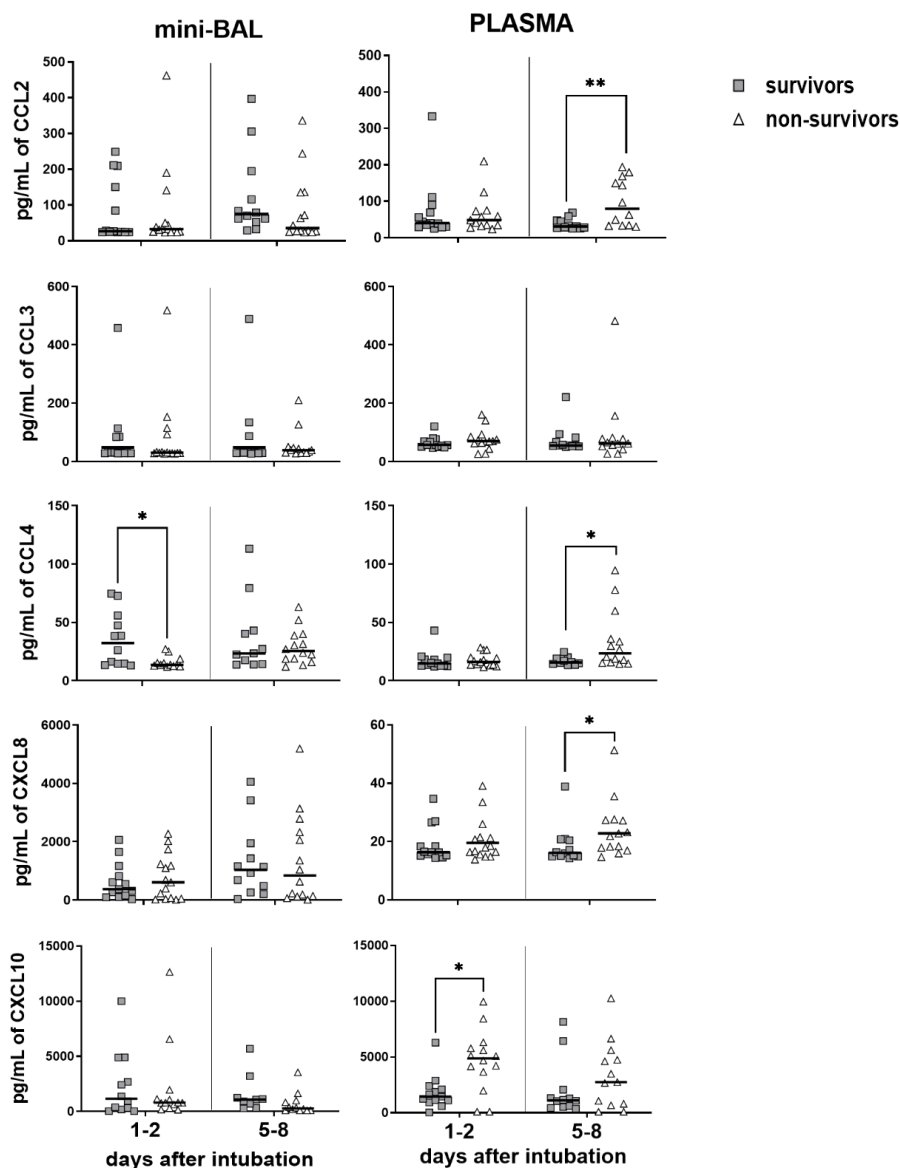


Figure 2: Levels of chemokines in survival and non-survivors' group. Chemokines were measured in mini-BAL and plasma up to 48 hours on days 1-2 and around day 7 (days 5-8) of intubation. Survivors (gray square) n=13 (days 1-2) and n=12 (days 5-8). Non-survivors (open triangle) n=15 (days 1-2) and n=14 (days 5-8). Differences between groups were analyzed using the Mann-Whitney test and are indicated by asterisks (*) when statistically significant ($P < 0.05$). The black lines represent the median of each group. Outliers were identified by the ROUT method ($Q=1\%$).

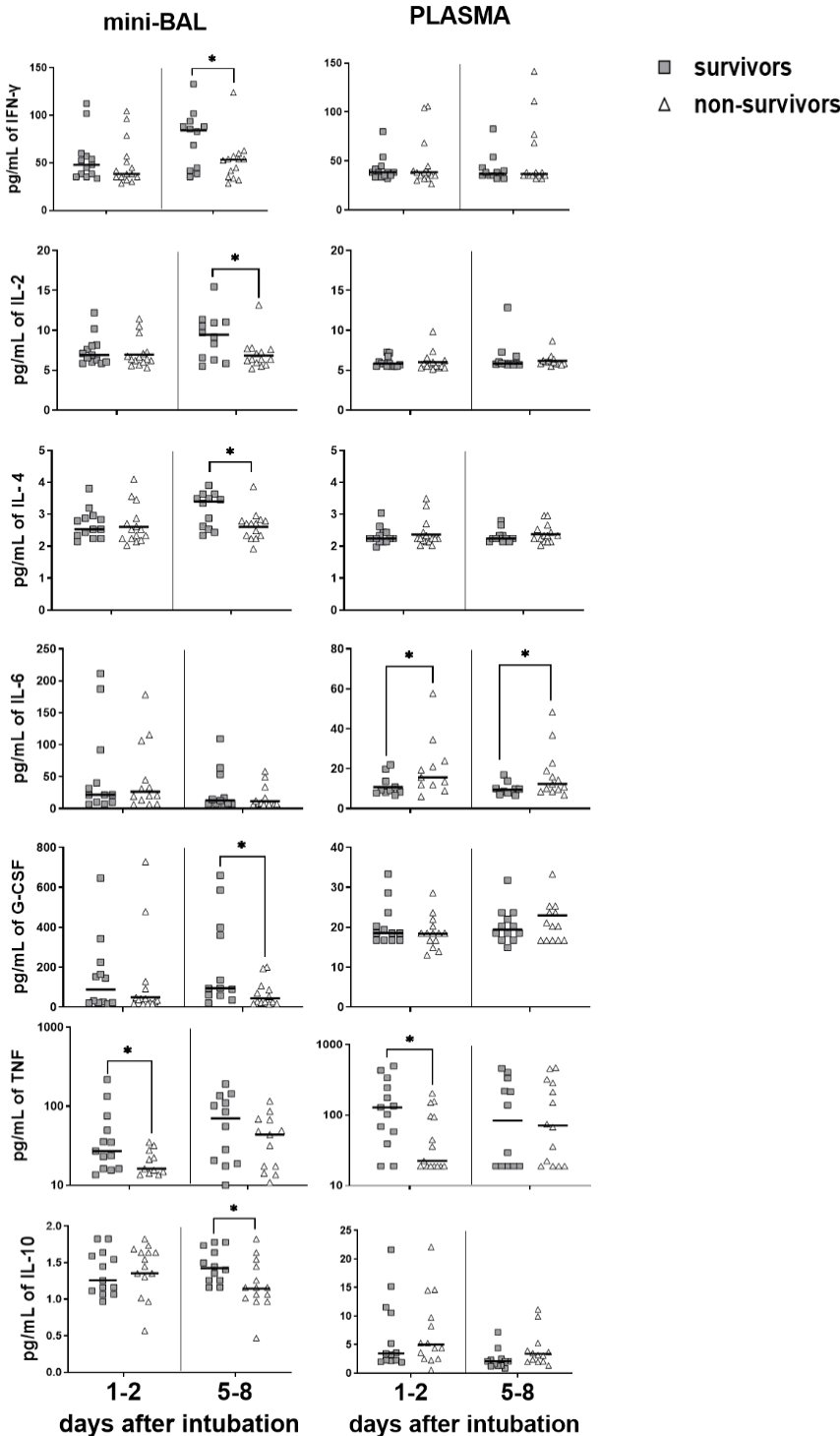


Figure 3: Levels of cytokines in survival and non-survivor`s group. Cytokines were measured in mini-BAL and plasma up to 48 hours on the days 1-2 (days 1-2) and around day 7 (days 5-8) of intubation. Survivors (gray square) n=13 (days1-2) and n=12 (days 5-8). Non-survivors (open triangle) n=15 (days 1-2) and n=14 (days 5-8). Differences between groups survivors and non-survivors on day 1-2 and on day 5-8 were analyzed by Mann-Whitney test and are indicated by asterisks (*) when statistically significant (P< 0.05). The black lines represent the median of each group. Outliers were identified by ROUT test (Q=1%).

Systemic inflammation is associated with worse PaO₂/FiO₂ ratio

Since respiratory failure is a marker of poor evolution of COVID-19, we decided to investigate whether the pulmonary oxygen exchange capacity, as measured by the PaO₂/FiO₂ ratio, was associated with either lung or systemic inflammation. The PaO₂/FiO₂ ratio is commonly used to evaluate the degree of hypoxemia [16], with a value equal to or below 300 mmHg indicating the presence of acute respiratory distress syndrome according to the Berlin definition [17]. In our study, we chose the cutoff value of 150 mmHg because it indicates worsening of lung function and the need for prone position to improve lung oxygenation capacity in acute respiratory distress syndrome (ARDS) [18].

We observed patients with a PaO₂/FiO₂ ratio equal to or greater than 150 mmHg on point D1-2 of intubation, i.e. patients with better pulmonary function, displayed increased TNF and CXCL8 levels in the lungs (Figure 4). On the other hand, patients with worse pulmonary function with a PaO₂/FiO₂ lower than 150mmHg on D1-2 presented increased levels of inflammatory cytokines such as IFN- γ and IL-5 in the plasma (Figure 4). Notably, these differences were no longer observed on D5-8 of intubation. These findings also suggest that high inflammatory cytokines levels measured in plasma were associated with worse lung function, as measured by the PaO₂/FiO₂ ratio at the beginning of the critical phase of infection, while pulmonary inflammation seems associated with better lung function.

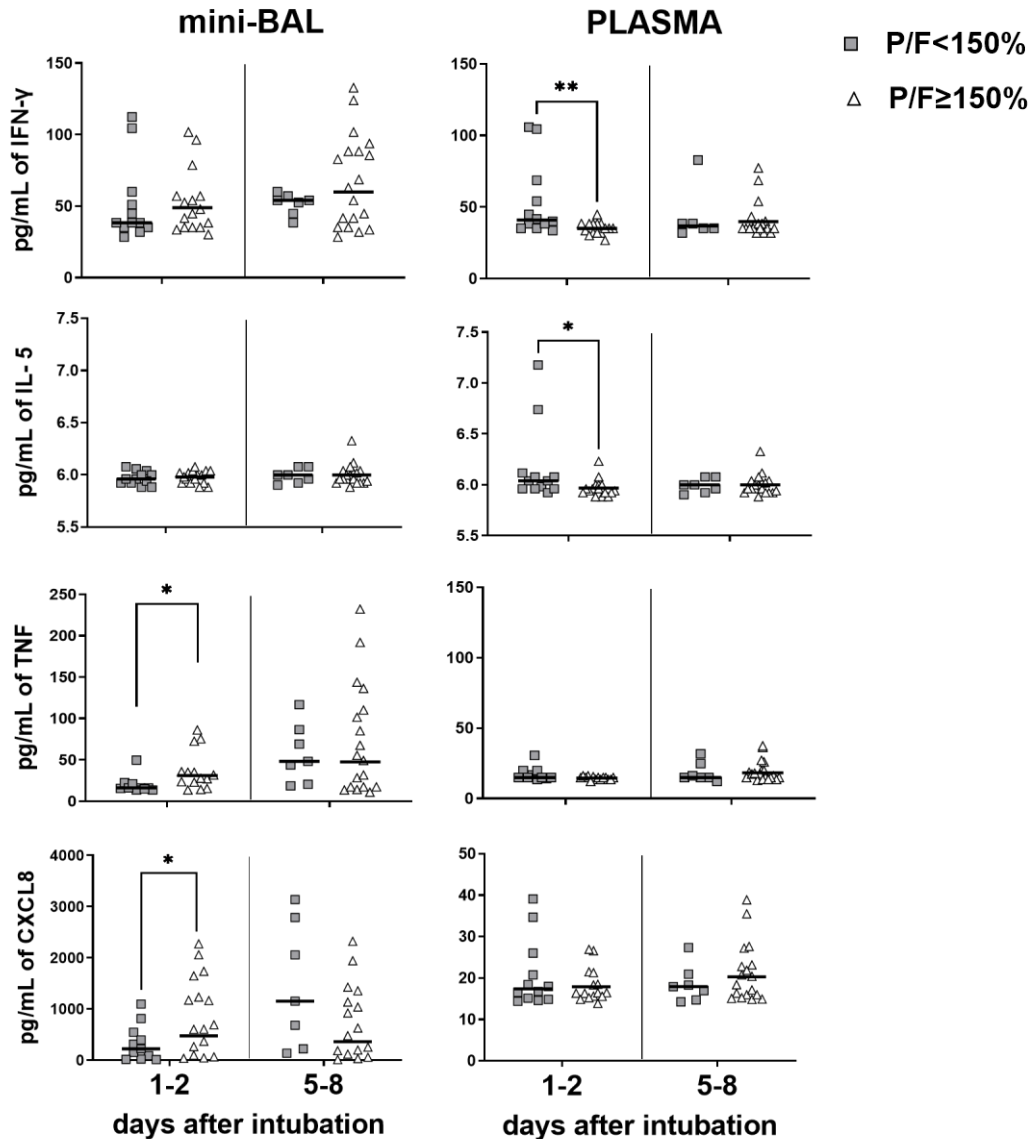


Figure 4: Cytokines/chemokines when $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 150\text{mmHg}$. Cytokines/chemokines measured in mini bronchoalveolar lavage (mini-BAL) and plasma when the $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (P/F) ratio $\text{P/F} < 150\text{mmHg}$ compared with $\text{P/F} \geq 150\text{mmHg}$ up to 48 hours on the day 1 (days 1-2) and around day 7 (days 5-8) of intubation. $\text{P/F} < 150\text{mmHg}$ (gray square) $n=12$ (days 1-2) and $n=7$ (days 5-8). $\text{P/F} \geq 150\text{mmHg}$ (open triangle) $n=16$ (days 1-2) and $n=19$ (days 5-8). The test The Mann-Whitney test was used for statistical analysis and was indicated by asterisks (*) when ($P < 0.05$) and (**) when ($P < 0.01$). The black lines represent the median of each group. Outliers were identified by the ROUT test ($Q=1\%$).

Discussion

The study of immune response in critical COVID-19 patients is important for providing information on the pathophysiology of respiratory failure and death associated with SARS-CoV-2 infection, especially in patients who require mechanical ventilation, where mortality ranges from 25% to 34%. [19]. There is ample evidence of immune system dysregulation in severe and critical COVID-19 cases [3, 20-22]. However, few studies have focused on the evolution of pulmonary and systemic inflammation in critical patients who recover or die. Although it is established that systemic inflammation can lead to multi-organ dysfunction in critical COVID-19 [23, 24], the respiratory system is typically the initial site of infection, making it necessary to understand and study the inflammation in both sites. Therefore, studying the systemic and pulmonary inflammatory response in critical COVID-19 patients and understanding how these responses occur in the survivors` group compared to non-survivors is important for comprehending the immunopathogenesis and gaining insights into appropriate treatment management.

Our data show that distinct inflammatory processes are occurring separately in the pulmonary and systemic sites, which significantly impact the infection's outcome. This finding aligns with the study conducted by Zaid et al., which suggests that plasma cytokines may not reliably indicate inflammation in the lungs of severe COVID-19 patients [13]. Indeed, we found no correlation between lung and blood cytokines levels, but a strong correlation within each site. For instance, when comparing the pulmonary and systemic sites, we observed that the non-survivors displayed higher inflammation in the systemic site with high levels of CCL2, CCL4, CXCL8, CXCL10, and IL-6, primarily within days 5-8 after intubation. On the other hand, survivors showed an effective pulmonary inflammation with high levels of mini-BAL TNF and CCL4 within the first 48 hours after intubation and exhibited increased levels of IFN- γ , IL-2, IL-4 and, G-CSF around 7 days after intubation.

Other studies have also indicated severity associated with increased levels of plasma chemokines, such as CCL2 [21, 25], CXCL8 [25, 26] and CXCL10 [25, 26] in severe COVID-19. The increased presence of chemokines CCL2, CCL4, CXCL8, and CXCL10 in the plasma was observed among the Wuhan, Alpha, Delta, and Omicron variants of moderate to severe COVID-19 patients when compared to healthy individuals. The authors suggest that these chemokines could potentially serve as biomarkers of disease severity or as targets for anti-inflammatory interventions [25]. Increased levels of chemokines in plasma have been associated with an impaired influx of

monocytes, neutrophils, and lymphocytes into the lungs. Recent reports have described an enrichment of alveolar space with macrophages [27, 28], T lymphocytes [27], and neutrophils [27-29]. On the hand, the presence of chemokines in the lungs is associated with an increased influx of inflammatory cells [13]. These findings agree with our observations that survivors show higher cytokine and chemokine levels in the lungs, possibly allowing an effective inflammation development, whereas non-survivors demonstrate elevated levels in the blood, which may impair the migration of inflammatory cells to the lungs. Indeed, decreased levels of CD4+ T cells in the lungs have been associated with failure to extubate and mortality [30]. Likewise, reduced pulmonary neutrophil infiltration is also associated with higher mortality in severe COVID-19 patients over 60 years old [29]. These findings highlight the harmful effects of increased plasma chemokine levels, and in our study, this elevated systemic concentration of cytokine and chemokines and an ineffective pulmonary inflammation are associated with mortality.

IL-6 has been identified as an important marker of poor COVID-19 evolution [9, 21, 31, 32]. In our study, we also observed a significant increase in IL-6 levels in the plasma of non-survivors at both time points, days 1-2 ($p=0.02$) and days 5-8 ($p=0.04$) after intubation. This finding supports the use of IL-6 inhibitors as a therapeutic option for critical COVID-19 patients [32, 33]. Interestingly, survivors displayed higher levels of TNF in the lungs and plasma during the first 48 hours of intubation, which were also associated with higher levels of IL-10. Previous data from our group have shown that balanced proinflammatory and regulatory responses are important for the survival of critical COVID-19 patients [34]. Non-survivors, on the other hand, displayed dysfunctional pulmonary and systemic Tregs, which we speculate contribute to harmful inflammation [34].

Indeed, it is interesting to note that the pulmonary oxygen exchange capacity, as indicated by the $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio, presented higher correlations with plasma cytokine levels rather than with levels in the lungs. There is data to show a negative correlation of $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ with plasma levels of IL-6, G-CSF, CCL2, and CCL3 [21]. In our study, higher plasma levels of IFN- γ and IL-5 were also associated with $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio below 150 mmHg, suggesting that increased peripheral inflammation correlates with a decline in pulmonary oxygen exchange capacity. Even though plasma levels of TNF have been linked to a negative prognosis [9], your data on TNF indicate that both early pulmonary and systemic high TNF levels associate with favorable outcomes in critical patients. Indeed, not only TNF but also CXCL8 in the lungs were associated with a $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio

above 150 mmHg. This suggests that the presence of an effective inflammatory response in the lungs may be indicative of a better pulmonary oxygen exchange capacity in critically ill patients.

We are aware that this study has some limitations. We conducted these preliminary analyses on a sample size where the use of dexamethasone was not administered to all patients. Additionally, the patients were recruited from a single center, which could introduce a sampling bias.

This study provides evidence that inflammation is independently regulated in the lungs and periphery, demonstrating compartmentalization. Furthermore, we found that mortality is associated with dysregulation of the systemic immune response, and an effective balanced pulmonary inflammation is important for the survival of patients with critical COVID-19. This understanding has important implications for guiding the management of critical COVID-19, supporting the use of anti-cytokine and anti-inflammatory therapies, with the goal of reducing the systemic repercussions of uncontrolled inflammation and mortality caused by SARS-CoV-2.

Methods

Patients and Ethical aspects

This prospective cohort study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais, (CAAE: 31336920.5.0000.5149), and informed consent was obtained from all participants or their legal representatives. Data and samples were collected from patients who were admitted to the intensive care unit (ICU) at Hospital das Clínicas of the Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, from May 2020 to April 2021. Adult patients aged 18 years or older, diagnosed with COVID-19 and experiencing respiratory failure, who required invasive mechanical ventilation (MV) and had not received the SARS-CoV-2 vaccine, were included in the study. Samples were collected on two-time points: within the first 48 hours of intubation (D1-2), and around day 7 (D5-8) after intubation. Patients were followed up until the outcome (death or hospital discharge) and were later divided into two groups for analysis: survivors and non-survivors. Additional patients were enrolled to replace early withdrawals, as some patients died or were extubated before day 7 (see Figure S1 for a detailed of the timepoint for sample collection). The clinical management was exclusively determined by the healthcare team and followed the current guidelines of the hospital and Brazilian Ministry of Health.

Sample collection and processing of biological material

Peripheral blood and pulmonary secretion samples were collected on the same day at two timepoints: days 1-2 (D1-2) and days 5-8 (D5-8) of intubation. Peripheral blood was collected in heparinized vacuum collection tubes with a volume of 5mL. Plasma and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated by density gradient after centrifugation using a Ficoll Histopaque-1077 gradient (SIGMA-Aldrich). The plasma was stored in a freezer at -80°C until analysis of cytokines and chemokines, and cells were used in different studies (Gonçalves-Pereira, 2022).

Pulmonary secretion samples were collected by modified mini-bronchoalveolar lavage (mini-BAL) technique [35], using a smaller volume [36] and a closed tracheal aspiration system. Briefly, 10 mL of sterile 0.9% saline solution was instilled into the trachea, recovered, and immediately dispensed into a sterile secretion collection bottle, keeping the system closed during the procedure. The pulmonary secretion was processed within two hours of collection using the method described by Pizzichini et al. (1996), which consists of diluting the pulmonary secretion sample 2X in phosphate buffer saline (PBS 1x) with a pH of 7.4 containing 0.1% dithiothreitol (LGC Biotechnology), vortexing for 15 seconds (s), letting it rest for 10 minutes (min), and vortexing again for 15s [37]. The samples were then diluted 4X in PBS 1x and subjected to centrifugation at 200g for 10 minutes. Finally, the supernatant was collected and stored in a freezer at -80°C for further analysis of cytokines and chemokines, while the cells were used for different experiments [2, 34].

Measurement of cytokine and chemokine

The levels of CCL2, CCL4, CXCL8, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, TNF, and IFN- γ were measured using the Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 17-plex Assay (Bio-Rad), while CCL3, CCL5, and CXCL-10 were measured using the Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 3-plex Assay (Bio-Rad), in accordance with the manufacturer's instructions. The Bio-Plex™ 200 System (Bio-Rad) and Bio-Plex Manager™ software version 6.1 (Bio-Rad) was used for sample analysis. However, IL-7 was not detectable and CCL5 was detectable in only 42% of the total samples (or in only 31% of the pulmonary secretion supernatant), and therefore, they were excluded from the analysis.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the GraphPad Prisma software version 9.5.0. The data were described in the form of proportion, central tendency, and distribution. The Fisher exact test was used to compare qualitative variables, while Mann-Whitney test was used for continuous variables. Correlation analysis was conducted using the nonparametric Spearman R test. Outliers were analyzed using the ROUT method (Q = 1%) available in the GraphPad Prisma software version 9.5.0. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant in all analyses, using a two-tailed test.

Supplemental material

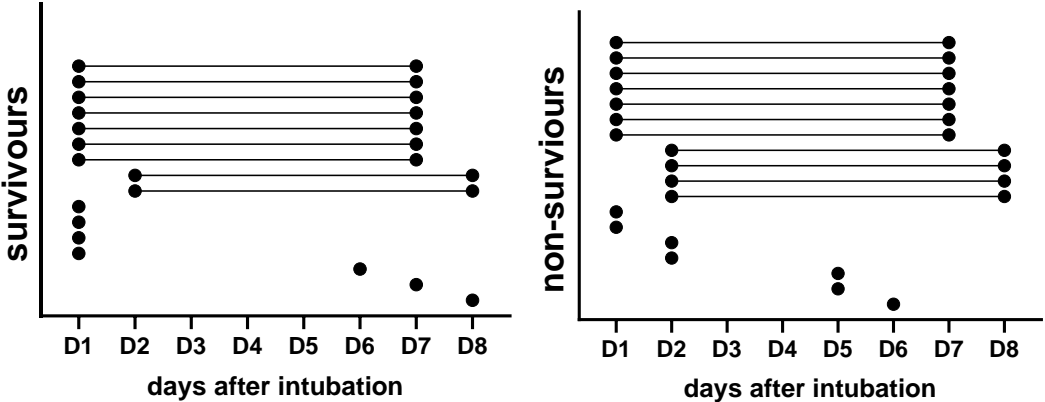


Figure S1: Samples of survivors and non-survivors` groups. Survivors: n=13 (days 1-2) and n=12 (days 6-7). Non-survivors: n=15 (days 1-2) and n=14 (days 5-8).

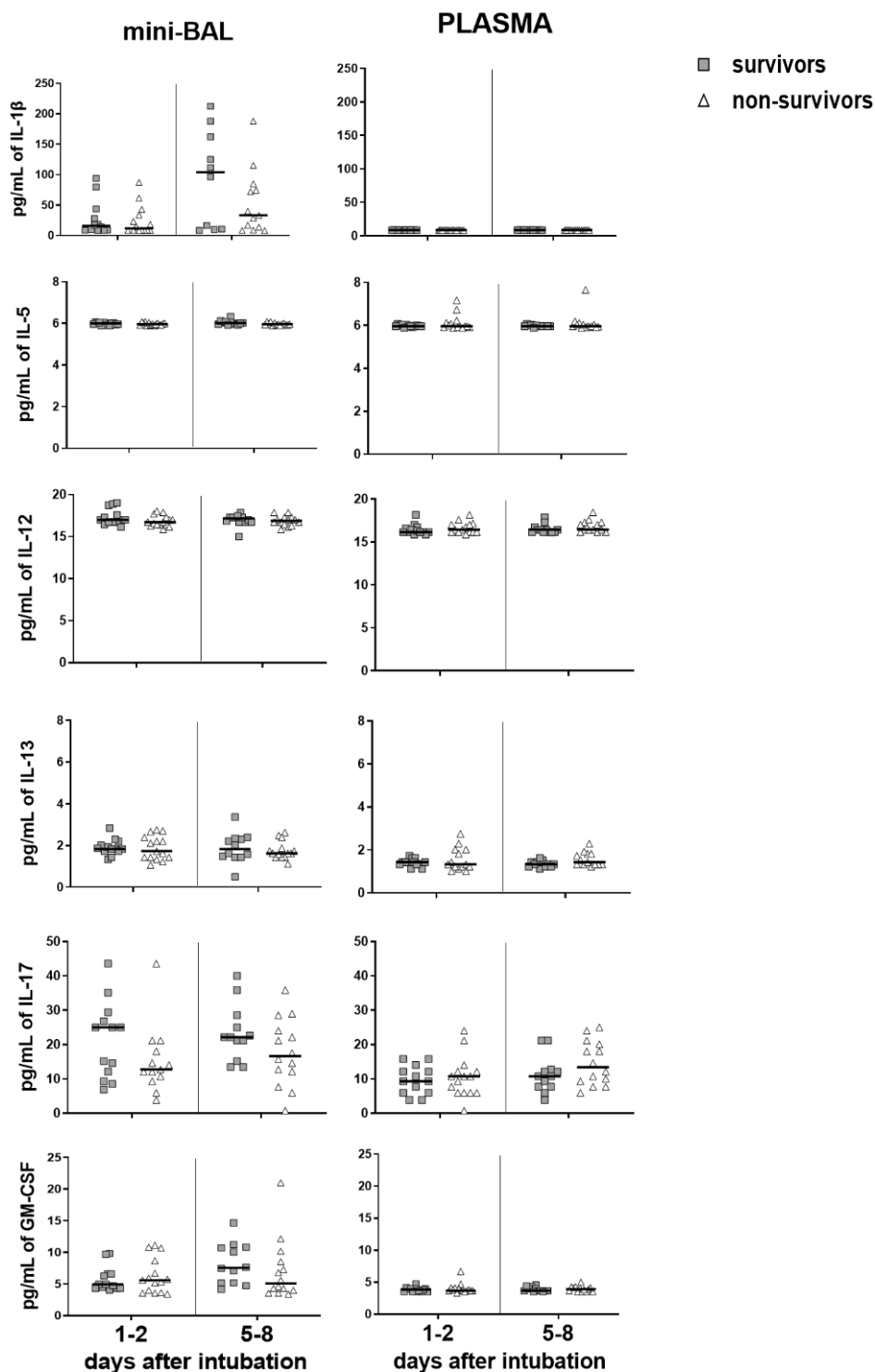


Figure S2: Levels of cytokines in survival and non-survivors' group. Cytokines measured in mini-BAL and plasma up to 48 hours on the day 1 (days 1-2) and around day 7 (days 5-8) of intubation. Survivors (gray square) n=13 (days 1-2) and n=12 (days 5-8). Non-survivors (open triangle) n=15 (days 1-2) and n=14 (days 5-8). Differences between groups were analyzed using the Mann-Whitney test. The black lines represent the median of each group. Outliers were identified by the ROUT method (Q=1%)

Table S1: Correlation between cytokines and chemokines measured in mini-BAL and clinical/laboratory data on days 1-2.

| p/r | CCL2 | CCL3 | CCL4 | CXCL8 | CXCL10 | TNF | IL-1 β | IL-6 | IL-12 | G-CSF | GM-CSF | IFN- γ | IL-4 | IL-5 | IL-13 | IL-17 | IL-2 | IL-10 | SOFA | CRP | lactate | leukocyte | neutrophil | lymphocyte | platet | creatinine | bilirubin | PaO ₂ /FiO ₂ |
|------------------------------------|------|------|------|-------|--------|------|--------------|------|-------|-------|--------|---------------|------|------|-------|-------|------|-------|-------|-------|---------|-----------|------------|------------|--------|------------|-----------|------------------------------------|
| CCL2 | 1 | 0.73 | 0.58 | 0.46 | 0.61 | 0.61 | 0.32 | 0.62 | 0.48 | 0.64 | 0.70 | 0.63 | 0.67 | 0.40 | 0.42 | 0.63 | 0.66 | 0.70 | 0.28 | -0.12 | -0.16 | -0.07 | -0.05 | 0.16 | -0.05 | 0.11 | 0.08 | -0.02 |
| CCL3 | 0.00 | 1 | 0.81 | 0.55 | 0.70 | 0.84 | 0.46 | 0.57 | 0.67 | 0.71 | 0.66 | 0.69 | 0.77 | 0.53 | 0.41 | 0.75 | 0.70 | 0.56 | 0.11 | -0.32 | -0.11 | -0.21 | -0.20 | 0.09 | -0.09 | 0.19 | -0.01 | 0.17 |
| CCL4 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.73 | 0.59 | 0.90 | 0.73 | 0.66 | 0.83 | 0.83 | 0.78 | 0.90 | 0.87 | 0.58 | 0.70 | 0.90 | 0.84 | 0.61 | -0.02 | -0.41 | -0.13 | -0.05 | -0.07 | 0.30 | 0.10 | 0.11 | -0.03 | 0.23 |
| CXCL8 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.39 | 0.83 | 0.77 | 0.48 | 0.71 | 0.76 | 0.79 | 0.70 | 0.81 | 0.36 | 0.54 | 0.77 | 0.80 | 0.50 | -0.05 | -0.44 | -0.02 | 0.13 | 0.15 | 0.49 | 0.22 | 0.16 | -0.14 | 0.32 |
| CXCL10 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.05 | 1 | 0.49 | 0.13 | 0.49 | 0.47 | 0.36 | 0.42 | 0.48 | 0.51 | 0.35 | 0.34 | 0.45 | 0.43 | 0.37 | 0.38 | -0.23 | 0.01 | -0.18 | -0.18 | 0.02 | -0.05 | -0.10 | 0.11 | -0.12 |
| TNF | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 1 | 0.74 | 0.61 | 0.81 | 0.82 | 0.78 | 0.80 | 0.87 | 0.56 | 0.60 | 0.85 | 0.85 | 0.62 | -0.04 | -0.36 | -0.14 | -0.05 | -0.06 | 0.42 | 0.10 | 0.21 | -0.12 | 0.27 |
| IL-1 β | 0.09 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.51 | 0.00 | 1 | 0.40 | 0.58 | 0.65 | 0.76 | 0.70 | 0.73 | 0.51 | 0.66 | 0.67 | 0.74 | 0.48 | -0.04 | -0.40 | 0.13 | 0.27 | 0.21 | 0.58 | 0.19 | 0.30 | -0.02 | 0.34 |
| IL-6 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.03 | 1 | 0.59 | 0.69 | 0.78 | 0.69 | 0.69 | 0.39 | 0.63 | 0.75 | 0.71 | 0.68 | 0.02 | -0.14 | -0.14 | -0.08 | -0.11 | 0.29 | -0.03 | -0.07 | 0.05 | 0.02 |
| IL-12 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.76 | 0.64 | 0.71 | 0.73 | 0.41 | 0.66 | 0.86 | 0.78 | 0.46 | -0.05 | -0.38 | -0.14 | 0.01 | -0.01 | 0.44 | 0.25 | 0.14 | -0.14 | 0.34 |
| G-CSF | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.07 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.85 | 0.86 | 0.91 | 0.37 | 0.53 | 0.90 | 0.89 | 0.64 | -0.08 | -0.41 | -0.24 | -0.10 | -0.11 | 0.29 | -0.07 | 0.22 | -0.15 | 0.32 |
| GM-CSF | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.03 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.86 | 0.90 | 0.49 | 0.66 | 0.85 | 0.88 | 0.76 | 0.07 | -0.25 | -0.07 | 0.02 | 0.00 | 0.41 | 0.01 | 0.17 | 0.02 | 0.15 |
| IFN- γ | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.91 | 0.65 | 0.70 | 0.88 | 0.90 | 0.74 | -0.10 | -0.22 | -0.12 | 0.01 | -0.01 | 0.31 | -0.02 | 0.07 | 0.14 | 0.17 |
| IL-4 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.56 | 0.59 | 0.88 | 0.93 | 0.66 | 0.00 | -0.33 | -0.15 | -0.01 | -0.03 | 0.31 | -0.03 | 0.14 | 0.01 | 0.20 |
| IL-5 | 0.04 | 0.00 | 0.00 | 0.06 | 0.08 | 0.00 | 0.01 | 0.04 | 0.03 | 0.05 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.58 | 0.45 | 0.60 | 0.57 | -0.10 | 0.06 | 0.18 | 0.11 | 0.07 | 0.20 | -0.07 | 0.16 | 0.43 | 0.03 |
| IL-13 | 0.02 | 0.03 | 0.00 | 0.00 | 0.09 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.67 | 0.60 | 0.69 | -0.14 | -0.19 | 0.15 | 0.12 | 0.04 | 0.52 | 0.14 | -0.11 | 0.31 | 0.27 |
| IL-17 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.02 | 0.00 | 1 | 0.89 | 0.66 | -0.13 | -0.38 | -0.17 | 0.06 | 0.07 | 0.34 | 0.12 | 0.14 | -0.07 | 0.24 |
| IL-2 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.03 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.66 | 0.03 | -0.28 | -0.13 | 0.11 | 0.10 | 0.39 | 0.06 | 0.25 | -0.03 | 0.20 |
| IL-10 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.06 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.04 | -0.07 | -0.02 | 0.03 | -0.03 | 0.33 | -0.10 | 0.15 | 0.30 | 0.07 |
| SOFA | 0.16 | 0.57 | 0.93 | 0.81 | 0.05 | 0.83 | 0.83 | 0.90 | 0.80 | 0.70 | 0.72 | 0.61 | 0.99 | 0.61 | 0.46 | 0.50 | 0.88 | 0.85 | 1 | 0.07 | 0.10 | -0.02 | -0.09 | -0.06 | -0.08 | 0.34 | -0.01 | -0.23 |
| CRP | 0.54 | 0.10 | 0.03 | 0.02 | 0.26 | 0.06 | 0.04 | 0.49 | 0.05 | 0.03 | 0.21 | 0.26 | 0.08 | 0.75 | 0.34 | 0.05 | 0.15 | 0.72 | 0.74 | 1 | 0.09 | -0.08 | -0.09 | -0.14 | -0.22 | -0.12 | 0.41 | -0.37 |
| lactate | 0.43 | 0.59 | 0.50 | 0.92 | 0.97 | 0.47 | 0.50 | 0.46 | 0.48 | 0.21 | 0.73 | 0.55 | 0.44 | 0.37 | 0.45 | 0.38 | 0.52 | 0.91 | 0.61 | 0.64 | 1 | 0.32 | 0.17 | 0.40 | 0.11 | -0.03 | 0.56 | -0.06 |
| leukocyte | 0.74 | 0.28 | 0.81 | 0.50 | 0.37 | 0.82 | 0.16 | 0.68 | 0.95 | 0.61 | 0.93 | 0.98 | 0.95 | 0.58 | 0.56 | 0.74 | 0.57 | 0.87 | 0.94 | 0.67 | 0.10 | 1 | 0.95 | 0.41 | 0.54 | 0.29 | 0.12 | -0.14 |
| neutrophil | 0.80 | 0.30 | 0.71 | 0.44 | 0.39 | 0.77 | 0.27 | 0.58 | 0.95 | 0.58 | 1.00 | 0.97 | 0.86 | 0.74 | 0.83 | 0.73 | 0.62 | 0.87 | 0.64 | 0.66 | 0.38 | 0.00 | 1 | 0.25 | 0.54 | 0.24 | 0.05 | -0.07 |
| lymphocyte | 0.41 | 0.66 | 0.13 | 0.01 | 0.94 | 0.03 | 0.00 | 0.13 | 0.02 | 0.14 | 0.03 | 0.11 | 0.11 | 0.32 | 0.00 | 0.08 | 0.04 | 0.09 | 0.76 | 0.49 | 0.04 | 0.03 | 0.20 | 1 | 0.31 | 0.13 | 0.07 | 0.08 |
| platet | 0.79 | 0.66 | 0.60 | 0.26 | 0.80 | 0.61 | 0.33 | 0.87 | 0.20 | 0.71 | 0.98 | 0.92 | 0.89 | 0.73 | 0.49 | 0.56 | 0.76 | 0.61 | 0.70 | 0.25 | 0.58 | 0.00 | 0.00 | 0.10 | 1 | -0.15 | -0.06 | -0.13 |
| creatinine | 0.57 | 0.33 | 0.59 | 0.43 | 0.64 | 0.28 | 0.13 | 0.72 | 0.48 | 0.26 | 0.38 | 0.73 | 0.48 | 0.42 | 0.56 | 0.48 | 0.21 | 0.44 | 0.08 | 0.53 | 0.87 | 0.14 | 0.23 | 0.50 | 0.43 | 1 | -0.35 | 0.04 |
| bilirubin | 0.70 | 0.96 | 0.87 | 0.49 | 0.58 | 0.53 | 0.94 | 0.81 | 0.49 | 0.44 | 0.91 | 0.48 | 0.95 | 0.02 | 0.11 | 0.73 | 0.86 | 0.13 | 0.98 | 0.03 | 0.00 | 0.55 | 0.80 | 0.71 | 0.77 | 0.07 | 1 | -0.20 |
| PaO ₂ /FiO ₂ | 0.94 | 0.38 | 0.23 | 0.10 | 0.57 | 0.16 | 0.07 | 0.94 | 0.08 | 0.10 | 0.43 | 0.40 | 0.30 | 0.88 | 0.17 | 0.22 | 0.32 | 0.72 | 0.25 | 0.05 | 0.77 | 0.47 | 0.71 | 0.69 | 0.50 | 0.85 | 0.31 | 1 |

Spearman rank correlation test was used for statistical analysis. Statistically significant was considered $p < 0.05$.

Abbreviations: CRP, C-reactive protein; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN- γ , interferon γ ; IL, interleukin; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; PaO₂/FiO₂, arterial oxygen partial pressure/ fractional inspired oxygen; TNF, tumor necrosis factor.

Table S2: Correlation between cytokines and chemokines measured in plasma and clinical/laboratory data on days 1-2.

| p/r | CCL2 | CCL3 | CCL4 | CXCL8 | CXCL10 | TNF | IL-1 β | IL-6 | IL-12 | G-CSF | GM-CSF | IFN- γ | IL-4 | IL-5 | IL-13 | IL-17 | IL-2 | IL-10 | SOFA | CRP | lactate | leukocyte | neutrophil | lymphocyte | platelet | creatinine | bilirubin | PaO ₂ /FiO ₂ |
|------------------------------------|------|------|------|-------|--------|------|--------------|------|-------|-------|--------|---------------|------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|---------|-----------|------------|------------|----------|------------|-----------|------------------------------------|
| CCL2 | 1 | 0.26 | 0.27 | 0.65 | 0.51 | 0.53 | 0.57 | 0.63 | 0.51 | 0.53 | 0.63 | 0.71 | 0.61 | 0.50 | 0.73 | 0.40 | 0.69 | 0.44 | 0.18 | 0.17 | 0.13 | 0.04 | 0.02 | 0.03 | 0.00 | -0.01 | 0.15 | -0.37 |
| CCL3 | 0.19 | 1 | 0.70 | 0.42 | 0.62 | 0.47 | 0.50 | 0.50 | 0.23 | 0.63 | 0.63 | 0.44 | 0.53 | 0.22 | 0.38 | 0.59 | 0.59 | 0.06 | 0.12 | 0.09 | 0.04 | 0.29 | 0.20 | 0.13 | 0.27 | 0.09 | 0.14 | -0.27 |
| CCL4 | 0.17 | 0.00 | 1 | 0.41 | 0.42 | 0.40 | 0.48 | 0.45 | 0.17 | 0.45 | 0.51 | 0.48 | 0.56 | 0.07 | 0.36 | 0.79 | 0.46 | -0.05 | -0.14 | -0.15 | -0.11 | 0.20 | 0.15 | 0.21 | 0.21 | 0.09 | 0.03 | -0.13 |
| CXCL8 | 0.00 | 0.03 | 0.03 | 1 | 0.49 | 0.61 | 0.71 | 0.64 | 0.47 | 0.68 | 0.73 | 0.66 | 0.74 | 0.41 | 0.47 | 0.66 | 0.70 | 0.26 | 0.19 | -0.02 | 0.16 | 0.17 | 0.01 | 0.16 | -0.09 | 0.24 | 0.02 | -0.13 |
| CXCL10 | 0.01 | 0.00 | 0.03 | 0.01 | 1 | 0.44 | 0.40 | 0.67 | 0.12 | 0.55 | 0.47 | 0.43 | 0.51 | -0.03 | 0.18 | 0.33 | 0.53 | 0.42 | 0.14 | 0.40 | 0.02 | 0.03 | -0.01 | -0.01 | 0.02 | -0.10 | 0.29 | -0.18 |
| TNF | 0.00 | 0.01 | 0.03 | 0.00 | 0.02 | 1 | 0.81 | 0.61 | 0.44 | 0.80 | 0.75 | 0.76 | 0.80 | 0.42 | 0.54 | 0.65 | 0.69 | 0.22 | 0.13 | 0.29 | -0.01 | -0.14 | -0.26 | -0.12 | -0.21 | 0.21 | 0.09 | -0.35 |
| IL-1 β | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.04 | 0.00 | 1 | 0.76 | 0.54 | 0.71 | 0.76 | 0.77 | 0.80 | 0.52 | 0.56 | 0.72 | 0.72 | 0.30 | 0.07 | 0.08 | -0.13 | 0.17 | 0.05 | 0.01 | 0.04 | 0.31 | -0.08 | -0.29 |
| IL-6 | 0.00 | 0.01 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.41 | 0.58 | 0.60 | 0.74 | 0.80 | 0.38 | 0.45 | 0.58 | 0.67 | 0.37 | 0.15 | 0.29 | 0.00 | 0.16 | 0.04 | -0.02 | 0.11 | 0.04 | 0.34 | -0.39 |
| IL-12 | 0.01 | 0.24 | 0.38 | 0.01 | 0.54 | 0.02 | 0.00 | 0.03 | 1 | 0.40 | 0.65 | 0.60 | 0.56 | 0.79 | 0.67 | 0.48 | 0.48 | 0.38 | 0.04 | -0.11 | 0.04 | 0.09 | 0.05 | -0.08 | 0.01 | 0.23 | -0.16 | -0.33 |
| G-CSF | 0.00 | 0.00 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.04 | 1 | 0.80 | 0.76 | 0.74 | 0.37 | 0.55 | 0.61 | 0.87 | 0.23 | 0.08 | 0.20 | 0.03 | 0.04 | -0.08 | 0.04 | -0.03 | 0.00 | 0.17 | -0.38 |
| GM-CSF | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.81 | 0.77 | 0.53 | 0.60 | 0.71 | 0.79 | 0.18 | -0.04 | 0.13 | 0.16 | 0.18 | 0.05 | 0.23 | 0.07 | 0.10 | 0.10 | -0.36 |
| IFN- γ | 0.00 | 0.02 | 0.01 | 0.00 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.86 | 0.57 | 0.71 | 0.71 | 0.76 | 0.37 | 0.15 | 0.15 | 0.05 | 0.08 | -0.01 | 0.06 | 0.04 | 0.15 | 0.21 | -0.50 |
| IL-4 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.54 | 0.61 | 0.80 | 0.78 | 0.32 | 0.13 | 0.19 | 0.01 | 0.04 | -0.08 | 0.02 | -0.07 | 0.30 | 0.13 | -0.40 |
| IL-5 | 0.01 | 0.25 | 0.72 | 0.03 | 0.89 | 0.03 | 0.00 | 0.04 | 0.00 | 0.06 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.81 | 0.47 | 0.50 | 0.31 | 0.24 | -0.05 | 0.15 | 0.11 | 0.08 | -0.16 | -0.06 | 0.27 | 0.03 | -0.49 |
| IL-13 | 0.00 | 0.05 | 0.06 | 0.01 | 0.35 | 0.00 | 0.00 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.54 | 0.64 | 0.32 | 0.21 | -0.07 | 0.11 | 0.09 | 0.09 | -0.09 | 0.02 | 0.14 | 0.05 | -0.41 |
| IL-17 | 0.03 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.09 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 1 | 0.61 | 0.13 | -0.06 | -0.06 | 0.10 | 0.19 | 0.06 | 0.19 | 0.03 | 0.35 | 0.03 | -0.30 |
| IL-2 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.24 | 0.14 | 0.11 | 0.11 | 0.10 | 0.00 | -0.02 | 0.14 | -0.05 | 0.21 | -0.39 |
| IL-10 | 0.02 | 0.77 | 0.79 | 0.18 | 0.03 | 0.25 | 0.12 | 0.05 | 0.05 | 0.23 | 0.36 | 0.05 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.52 | 0.22 | 1 | 0.50 | 0.10 | 0.00 | -0.15 | -0.20 | 0.06 | -0.27 | 0.26 | -0.01 | -0.18 |
| SOFA | 0.37 | 0.55 | 0.48 | 0.34 | 0.48 | 0.50 | 0.73 | 0.44 | 0.85 | 0.70 | 0.86 | 0.44 | 0.50 | 0.22 | 0.30 | 0.78 | 0.48 | 0.01 | 1 | 0.07 | 0.10 | -0.02 | -0.09 | -0.06 | -0.08 | 0.34 | -0.01 | -0.23 |
| CRP | 0.37 | 0.65 | 0.46 | 0.92 | 0.04 | 0.13 | 0.67 | 0.13 | 0.56 | 0.31 | 0.50 | 0.44 | 0.32 | 0.80 | 0.72 | 0.75 | 0.58 | 0.62 | 0.74 | 1 | 0.09 | -0.08 | -0.09 | -0.14 | -0.22 | -0.12 | 0.41 | -0.37 |
| lactate | 0.51 | 0.85 | 0.57 | 0.41 | 0.92 | 0.95 | 0.50 | 0.99 | 0.82 | 0.88 | 0.42 | 0.81 | 0.96 | 0.44 | 0.58 | 0.60 | 0.57 | 0.98 | 0.61 | 0.64 | 1 | 0.32 | 0.17 | 0.40 | 0.11 | -0.03 | 0.56 | -0.06 |
| leukocyte | 0.86 | 0.13 | 0.31 | 0.40 | 0.88 | 0.49 | 0.38 | 0.41 | 0.64 | 0.82 | 0.36 | 0.67 | 0.83 | 0.56 | 0.63 | 0.33 | 0.63 | 0.43 | 0.94 | 0.67 | 0.10 | 1 | 0.95 | 0.41 | 0.54 | 0.29 | 0.12 | -0.14 |
| neutrophil | 0.92 | 0.31 | 0.44 | 0.95 | 0.96 | 0.19 | 0.79 | 0.85 | 0.80 | 0.70 | 0.80 | 0.96 | 0.69 | 0.68 | 0.63 | 0.76 | 0.99 | 0.32 | 0.64 | 0.66 | 0.38 | 0.00 | 1 | 0.25 | 0.54 | 0.24 | 0.05 | -0.07 |
| lymphocyte | 0.89 | 0.50 | 0.29 | 0.41 | 0.98 | 0.55 | 0.98 | 0.91 | 0.69 | 0.86 | 0.24 | 0.77 | 0.93 | 0.42 | 0.66 | 0.33 | 0.92 | 0.76 | 0.76 | 0.49 | 0.04 | 0.03 | 0.20 | 1 | 0.31 | 0.13 | 0.07 | 0.08 |
| platelet | 0.99 | 0.17 | 0.27 | 0.65 | 0.91 | 0.28 | 0.83 | 0.58 | 0.97 | 0.87 | 0.73 | 0.82 | 0.73 | 0.75 | 0.94 | 0.87 | 0.48 | 0.17 | 0.70 | 0.25 | 0.58 | 0.00 | 0.00 | 0.10 | 1 | -0.15 | -0.06 | -0.13 |
| creatinine | 0.95 | 0.65 | 0.66 | 0.22 | 0.60 | 0.27 | 0.11 | 0.82 | 0.23 | 0.98 | 0.61 | 0.46 | 0.12 | 0.16 | 0.48 | 0.07 | 0.80 | 0.18 | 0.08 | 0.53 | 0.87 | 0.14 | 0.23 | 0.50 | 0.43 | 1 | -0.35 | 0.04 |
| bilirubin | 0.43 | 0.48 | 0.88 | 0.90 | 0.13 | 0.66 | 0.70 | 0.08 | 0.42 | 0.38 | 0.60 | 0.28 | 0.50 | 0.90 | 0.79 | 0.89 | 0.28 | 0.95 | 0.98 | 0.03 | 0.00 | 0.55 | 0.80 | 0.71 | 0.77 | 0.07 | 1 | -0.20 |
| PaO ₂ /FiO ₂ | 0.05 | 0.17 | 0.53 | 0.50 | 0.37 | 0.07 | 0.13 | 0.04 | 0.08 | 0.04 | 0.06 | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.03 | 0.12 | 0.04 | 0.37 | 0.25 | 0.05 | 0.77 | 0.47 | 0.71 | 0.69 | 0.50 | 0.85 | 0.31 | 1 |

Spearman rank correlation test was used for statistical analysis. Statistically significant was considered $p < 0.05$.

Abbreviations: CRP, C-reactive protein; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN- γ , interferon γ ; IL, interleukin; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; PaO₂/FiO₂, arterial oxygen partial pressure/ fractional inspired oxygen; TNF, tumor necrosis factor.

Table S3: Correlation between cytokines and chemokines measured in mini-BAL and clinical/laboratory data on days 5-8.

| p/r | CCL2 | CCL3 | CCL4 | CXCL8 | CXCL10 | TNF | IL-1 β | IL-6 | IL-12 | G-CSF | GM-CSF | IFN- γ | IL-4 | IL-5 | IL-13 | IL-17 | IL-2 | IL-10 | SOFA | CRP | lactate | leukocyte | neutrophil | lymphocyte | platelet | creatinine | bilirubin | PaO ₂ /FiO ₂ |
|------------------------------------|------|------|------|-------|--------|-------|--------------|------|-------|-------|--------|---------------|------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|---------|-----------|------------|------------|----------|------------|-----------|------------------------------------|
| CCL2 | 1 | 0.67 | 0.27 | 0.38 | 0.45 | 0.44 | 0.30 | 0.49 | 0.36 | 0.46 | 0.73 | 0.60 | 0.58 | 0.34 | 0.49 | 0.70 | 0.58 | 0.49 | -0.19 | -0.09 | -0.19 | 0.06 | -0.03 | -0.20 | 0.18 | 0.06 | 0.04 | -0.23 |
| CCL3 | 0.00 | 1 | 0.37 | 0.18 | 0.44 | 0.24 | 0.33 | 0.35 | 0.09 | 0.28 | 0.41 | 0.40 | 0.37 | 0.02 | 0.20 | 0.49 | 0.40 | 0.15 | -0.26 | -0.05 | 0.04 | 0.26 | 0.26 | 0.01 | 0.27 | 0.18 | 0.03 | -0.27 |
| CCL4 | 0.18 | 0.06 | 1 | 0.57 | -0.06 | 0.61 | 0.33 | 0.26 | 0.52 | 0.26 | 0.24 | 0.30 | 0.36 | 0.37 | 0.52 | 0.49 | 0.32 | 0.01 | -0.08 | -0.13 | 0.05 | -0.27 | -0.28 | -0.06 | -0.05 | 0.05 | -0.10 | -0.29 |
| CXCL8 | 0.06 | 0.37 | 0.00 | 1 | 0.13 | 0.58 | 0.27 | 0.59 | 0.65 | 0.43 | 0.37 | 0.44 | 0.42 | 0.56 | 0.71 | 0.62 | 0.45 | 0.41 | -0.38 | -0.29 | 0.24 | -0.34 | -0.39 | -0.06 | 0.05 | -0.29 | 0.07 | 0.03 |
| CXCL10 | 0.02 | 0.03 | 0.78 | 0.52 | 1 | -0.08 | 0.08 | 0.36 | -0.05 | 0.36 | 0.30 | 0.20 | 0.13 | -0.07 | 0.04 | 0.29 | 0.22 | 0.13 | -0.34 | -0.20 | 0.00 | 0.27 | 0.28 | -0.03 | 0.12 | 0.04 | 0.24 | -0.04 |
| TNF | 0.02 | 0.24 | 0.00 | 0.00 | 0.70 | 1 | 0.62 | 0.44 | 0.79 | 0.45 | 0.63 | 0.70 | 0.77 | 0.57 | 0.82 | 0.64 | 0.70 | 0.42 | -0.32 | -0.15 | 0.08 | 0.00 | -0.08 | 0.12 | 0.07 | -0.10 | -0.15 | 0.06 |
| IL-1 β | 0.14 | 0.10 | 0.09 | 0.18 | 0.69 | 0.00 | 1 | 0.45 | 0.37 | 0.54 | 0.66 | 0.75 | 0.77 | 0.42 | 0.43 | 0.54 | 0.75 | 0.41 | -0.26 | -0.09 | 0.02 | 0.35 | 0.26 | 0.42 | 0.27 | -0.02 | 0.15 | 0.41 |
| IL-6 | 0.01 | 0.08 | 0.20 | 0.00 | 0.07 | 0.02 | 0.02 | 1 | 0.42 | 0.65 | 0.58 | 0.75 | 0.64 | 0.56 | 0.47 | 0.71 | 0.78 | 0.61 | -0.37 | 0.04 | -0.06 | -0.14 | -0.20 | 0.05 | 0.19 | -0.08 | 0.16 | 0.17 |
| IL-12 | 0.07 | 0.68 | 0.01 | 0.00 | 0.80 | 0.00 | 0.07 | 0.03 | 1 | 0.30 | 0.52 | 0.51 | 0.62 | 0.75 | 0.89 | 0.58 | 0.50 | 0.54 | -0.25 | -0.11 | 0.26 | -0.14 | -0.22 | 0.03 | 0.07 | -0.39 | 0.04 | -0.21 |
| G-CSF | 0.02 | 0.17 | 0.20 | 0.03 | 0.07 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.14 | 1 | 0.77 | 0.75 | 0.73 | 0.30 | 0.30 | 0.77 | 0.72 | 0.32 | -0.41 | -0.01 | -0.08 | 0.04 | -0.05 | 0.07 | 0.33 | -0.15 | 0.18 | 0.22 |
| GM-CSF | 0.00 | 0.04 | 0.25 | 0.07 | 0.14 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 1 | 0.86 | 0.89 | 0.46 | 0.57 | 0.85 | 0.84 | 0.59 | -0.24 | 0.04 | -0.09 | 0.24 | 0.15 | 0.07 | 0.24 | -0.14 | 0.30 | 0.08 |
| IFN- γ | 0.00 | 0.04 | 0.13 | 0.03 | 0.33 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.95 | 0.56 | 0.57 | 0.84 | 0.97 | 0.60 | -0.28 | -0.01 | 0.01 | 0.12 | 0.03 | 0.15 | 0.37 | 0.02 | 0.21 | 0.28 |
| IL-4 | 0.00 | 0.06 | 0.07 | 0.03 | 0.54 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.57 | 0.62 | 0.84 | 0.92 | 0.55 | -0.27 | -0.07 | 0.03 | 0.24 | 0.13 | 0.27 | 0.31 | -0.09 | 0.20 | 0.24 |
| IL-5 | 0.09 | 0.93 | 0.06 | 0.00 | 0.72 | 0.00 | 0.03 | 0.00 | 0.00 | 0.13 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.71 | 0.56 | 0.54 | 0.60 | -0.09 | -0.02 | 0.32 | -0.16 | -0.25 | 0.05 | 0.15 | -0.31 | 0.20 | 0.00 |
| IL-13 | 0.01 | 0.32 | 0.01 | 0.00 | 0.84 | 0.00 | 0.03 | 0.02 | 0.00 | 0.14 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.63 | 0.57 | 0.47 | -0.19 | -0.06 | 0.17 | -0.07 | -0.14 | -0.01 | 0.12 | -0.25 | 0.12 | -0.12 |
| IL-17 | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.15 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.84 | 0.51 | -0.25 | -0.04 | 0.11 | 0.09 | 0.02 | 0.04 | 0.23 | -0.19 | 0.29 | 0.08 |
| IL-2 | 0.00 | 0.05 | 0.11 | 0.02 | 0.28 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.64 | -0.30 | 0.01 | 0.01 | 0.13 | 0.04 | 0.20 | 0.29 | 0.04 | 0.18 | 0.33 |
| IL-10 | 0.01 | 0.46 | 0.97 | 0.04 | 0.52 | 0.03 | 0.04 | 0.00 | 0.00 | 0.11 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 1 | -0.28 | -0.15 | 0.10 | -0.15 | -0.21 | 0.16 | 0.13 | -0.22 | 0.16 | 0.05 | |
| SOFA | 0.37 | 0.21 | 0.71 | 0.06 | 0.10 | 0.12 | 0.21 | 0.07 | 0.22 | 0.04 | 0.26 | 0.18 | 0.20 | 0.67 | 0.36 | 0.22 | 0.14 | 0.17 | 1 | 0.32 | -0.13 | -0.07 | 0.00 | -0.15 | -0.24 | 0.34 | 0.34 | -0.14 |
| CRP | 0.66 | 0.82 | 0.52 | 0.14 | 0.32 | 0.47 | 0.67 | 0.86 | 0.59 | 0.96 | 0.85 | 0.95 | 0.74 | 0.92 | 0.75 | 0.86 | 0.98 | 0.45 | 0.12 | 1 | -0.41 | 0.10 | 0.09 | -0.22 | 0.13 | 0.28 | -0.11 | -0.13 |
| lactate | 0.36 | 0.86 | 0.80 | 0.24 | 0.99 | 0.71 | 0.93 | 0.79 | 0.20 | 0.71 | 0.66 | 0.96 | 0.87 | 0.11 | 0.40 | 0.61 | 0.97 | 0.64 | 0.52 | 0.04 | 1 | 0.10 | 0.15 | 0.16 | 0.04 | -0.43 | 0.39 | 0.11 |
| leukocyte | 0.77 | 0.19 | 0.18 | 0.09 | 0.18 | 0.98 | 0.08 | 0.51 | 0.48 | 0.86 | 0.24 | 0.55 | 0.25 | 0.42 | 0.74 | 0.66 | 0.51 | 0.48 | 0.75 | 0.64 | 0.63 | 1 | 0.97 | 0.54 | 0.17 | 0.05 | 0.13 | 0.29 |
| neutrophil | 0.89 | 0.19 | 0.16 | 0.05 | 0.17 | 0.70 | 0.20 | 0.34 | 0.28 | 0.79 | 0.47 | 0.87 | 0.52 | 0.22 | 0.51 | 0.94 | 0.83 | 0.31 | 1.00 | 0.68 | 0.48 | 0.00 | 1 | 0.49 | 0.11 | 0.07 | 0.22 | 0.25 |
| lymphocyte | 0.34 | 0.98 | 0.76 | 0.77 | 0.89 | 0.57 | 0.03 | 0.82 | 0.87 | 0.75 | 0.74 | 0.47 | 0.18 | 0.80 | 0.95 | 0.85 | 0.32 | 0.43 | 0.48 | 0.27 | 0.43 | 0.00 | 0.01 | 1 | 0.20 | 0.05 | -0.04 | 0.34 |
| platelet | 0.37 | 0.18 | 0.80 | 0.80 | 0.56 | 0.73 | 0.18 | 0.36 | 0.72 | 0.09 | 0.24 | 0.06 | 0.12 | 0.47 | 0.55 | 0.26 | 0.15 | 0.53 | 0.24 | 0.53 | 0.84 | 0.42 | 0.58 | 0.33 | 1 | 0.24 | -0.28 | 0.08 |
| creatinine | 0.76 | 0.37 | 0.82 | 0.15 | 0.83 | 0.61 | 0.93 | 0.71 | 0.05 | 0.46 | 0.49 | 0.92 | 0.68 | 0.12 | 0.21 | 0.35 | 0.86 | 0.28 | 0.09 | 0.16 | 0.03 | 0.80 | 0.73 | 0.82 | 0.24 | 1 | -0.45 | 0.04 |
| bilirubin | 0.85 | 0.90 | 0.67 | 0.76 | 0.31 | 0.54 | 0.51 | 0.49 | 0.85 | 0.45 | 0.19 | 0.37 | 0.40 | 0.41 | 0.62 | 0.22 | 0.45 | 0.51 | 0.15 | 0.64 | 0.09 | 0.57 | 0.36 | 0.88 | 0.24 | 0.05 | 1 | 0.09 |
| PaO ₂ /FiO ₂ | 0.26 | 0.18 | 0.16 | 0.88 | 0.83 | 0.78 | 0.04 | 0.42 | 0.29 | 0.27 | 0.71 | 0.16 | 0.24 | 0.99 | 0.55 | 0.71 | 0.10 | 0.82 | 0.50 | 0.53 | 0.60 | 0.15 | 0.22 | 0.09 | 0.69 | 0.84 | 0.72 | 1 |

Spearman rank correlation test was used for statistical analysis. Statistically significant was considered $p < 0.05$.

Abbreviations: CRP, C-reactive protein; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN- γ , interferon γ ; IL, interleukin; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; PaO₂/FiO₂, arterial oxygen partial pressure/ fractional inspired oxygen; TNF, tumor necrosis factor.

Table S4: Correlation between cytokines and chemokines measured in plasma and clinical/laboratory data on days 5-8.

| p/r | CCL2 | CCL3 | CCL4 | CXCL8 | CXCL10 | TNF | IL-1 β | IL-6 | IL-12 | G-CSF | GM-CSF | IFN- γ | IL-4 | IL-5 | IL-13 | IL-17 | IL-2 | IL-10 | SOFA | CRP | lactate | leukocyte | neutrophil | lymphocyte | platet | creatinine | bilirubin | PaO ₂ /FiO ₂ |
|------------------------------------|------|------|------|-------|--------|------|--------------|------|-------|-------|--------|---------------|------|------|-------|-------|------|-------|-------|-------|---------|-----------|------------|------------|--------|------------|-----------|------------------------------------|
| CCL2 | 1 | 0.27 | 0.42 | 0.41 | 0.42 | 0.61 | 0.76 | 0.62 | 0.73 | 0.56 | 0.55 | 0.59 | 0.65 | 0.33 | 0.74 | 0.52 | 0.70 | 0.63 | 0.09 | 0.29 | 0.07 | 0.01 | 0.07 | -0.19 | 0.12 | 0.16 | 0.09 | -0.17 |
| CCL3 | 0.18 | 1 | 0.60 | 0.58 | 0.76 | 0.53 | 0.49 | 0.27 | 0.25 | 0.28 | 0.28 | 0.23 | 0.42 | 0.26 | 0.24 | 0.55 | 0.39 | 0.18 | 0.11 | -0.16 | 0.10 | 0.05 | 0.03 | -0.05 | 0.08 | 0.23 | 0.11 | 0.40 |
| CCL4 | 0.03 | 0.00 | 1 | 0.59 | 0.59 | 0.48 | 0.44 | 0.47 | 0.40 | 0.47 | 0.45 | 0.18 | 0.31 | 0.20 | 0.46 | 0.88 | 0.47 | 0.40 | 0.44 | 0.06 | 0.09 | -0.07 | 0.05 | -0.21 | -0.22 | 0.35 | 0.22 | 0.18 |
| CXCL8 | 0.04 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.40 | 0.50 | 0.58 | 0.49 | 0.35 | 0.53 | 0.52 | 0.42 | 0.43 | 0.24 | 0.33 | 0.57 | 0.50 | 0.36 | 0.24 | 0.20 | -0.17 | 0.07 | 0.09 | -0.33 | -0.31 | 0.29 | 0.07 | 0.26 |
| CXCL10 | 0.03 | 0.00 | 0.00 | 0.04 | 1 | 0.62 | 0.54 | 0.24 | 0.47 | 0.41 | 0.31 | 0.40 | 0.52 | 0.40 | 0.36 | 0.55 | 0.45 | 0.54 | 0.24 | -0.19 | 0.17 | -0.07 | -0.03 | -0.06 | -0.11 | 0.15 | 0.29 | 0.12 |
| TNF | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 1 | 0.80 | 0.47 | 0.65 | 0.68 | 0.67 | 0.71 | 0.74 | 0.60 | 0.52 | 0.65 | 0.80 | 0.47 | 0.10 | 0.16 | -0.16 | 0.05 | 0.01 | -0.05 | 0.05 | 0.22 | 0.00 | 0.04 |
| IL-1 β | 0.00 | 0.01 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.55 | 0.72 | 0.80 | 0.82 | 0.65 | 0.77 | 0.37 | 0.54 | 0.63 | 0.64 | 0.50 | 0.13 | 0.37 | -0.14 | 0.08 | 0.08 | -0.15 | 0.09 | 0.33 | -0.06 | -0.01 |
| IL-6 | 0.00 | 0.18 | 0.02 | 0.01 | 0.24 | 0.02 | 0.00 | 1 | 0.38 | 0.64 | 0.60 | 0.43 | 0.42 | 0.28 | 0.52 | 0.59 | 0.47 | 0.21 | 0.23 | 0.47 | 0.09 | 0.22 | 0.22 | -0.11 | 0.10 | 0.20 | 0.19 | 0.23 |
| IL-12 | 0.00 | 0.22 | 0.04 | 0.08 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.05 | 1 | 0.59 | 0.62 | 0.69 | 0.61 | 0.52 | 0.71 | 0.54 | 0.72 | 0.63 | 0.20 | 0.09 | -0.14 | -0.13 | -0.08 | -0.19 | -0.06 | 0.12 | 0.08 | -0.27 |
| G-CSF | 0.00 | 0.17 | 0.01 | 0.01 | 0.04 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.91 | 0.63 | 0.55 | 0.30 | 0.59 | 0.59 | 0.53 | 0.42 | 0.14 | 0.35 | -0.12 | 0.01 | 0.01 | -0.24 | -0.04 | 0.40 | -0.16 | -0.18 |
| GM-CSF | 0.00 | 0.16 | 0.02 | 0.01 | 0.13 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.56 | 0.59 | 0.25 | 0.52 | 0.60 | 0.55 | 0.32 | 0.04 | 0.37 | -0.24 | -0.02 | -0.03 | -0.15 | 0.02 | 0.40 | -0.34 | 0.00 |
| IFN- γ | 0.00 | 0.26 | 0.37 | 0.03 | 0.04 | 0.00 | 0.00 | 0.03 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.60 | 0.47 | 0.53 | 0.35 | 0.80 | 0.54 | -0.14 | -0.02 | -0.02 | 0.23 | 0.19 | -0.04 | -0.17 | -0.04 | 0.12 | -0.11 |
| IL-4 | 0.00 | 0.03 | 0.12 | 0.03 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.03 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.30 | 0.36 | 0.40 | 0.68 | 0.55 | -0.13 | 0.17 | 0.06 | 0.11 | 0.13 | 0.06 | 0.17 | 0.03 | 0.07 | 0.12 |
| IL-5 | 0.09 | 0.20 | 0.32 | 0.23 | 0.04 | 0.00 | 0.06 | 0.16 | 0.01 | 0.13 | 0.22 | 0.02 | 0.14 | 1 | 0.35 | 0.39 | 0.50 | 0.19 | 0.13 | 0.17 | -0.19 | -0.19 | -0.26 | -0.40 | 0.01 | -0.10 | 0.22 | -0.09 |
| IL-13 | 0.00 | 0.24 | 0.02 | 0.10 | 0.07 | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.07 | 0.08 | 1 | 0.52 | 0.63 | 0.51 | 0.28 | 0.02 | 0.12 | -0.27 | -0.24 | -0.21 | -0.09 | 0.11 | 0.03 | -0.35 |
| IL-17 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.08 | 0.04 | 0.05 | 0.01 | 1 | 0.55 | 0.38 | 0.48 | 0.31 | -0.07 | -0.04 | 0.02 | -0.17 | -0.20 | 0.41 | 0.23 | 0.15 |
| IL-2 | 0.00 | 0.05 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 1 | 0.59 | -0.12 | 0.05 | -0.09 | 0.09 | 0.10 | -0.04 | -0.12 | 0.00 | -0.02 | -0.02 |
| IL-10 | 0.00 | 0.37 | 0.04 | 0.07 | 0.00 | 0.02 | 0.01 | 0.29 | 0.00 | 0.03 | 0.11 | 0.00 | 0.00 | 0.35 | 0.01 | 0.05 | 0.00 | 1 | 0.26 | 0.04 | -0.13 | 0.02 | 0.13 | -0.02 | -0.20 | 0.24 | 0.19 | -0.23 |
| SOFA | 0.66 | 0.59 | 0.03 | 0.25 | 0.25 | 0.64 | 0.54 | 0.26 | 0.34 | 0.51 | 0.83 | 0.51 | 0.53 | 0.55 | 0.18 | 0.01 | 0.57 | 0.21 | 1 | 0.32 | -0.13 | -0.07 | 0.00 | -0.15 | -0.24 | 0.34 | 0.34 | -0.14 |
| CRP | 0.15 | 0.44 | 0.75 | 0.32 | 0.35 | 0.42 | 0.07 | 0.02 | 0.65 | 0.08 | 0.06 | 0.91 | 0.41 | 0.42 | 0.91 | 0.13 | 0.81 | 0.86 | 0.12 | 1 | -0.41 | 0.10 | 0.09 | -0.22 | 0.13 | 0.28 | -0.11 | -0.13 |
| lactate | 0.74 | 0.63 | 0.65 | 0.40 | 0.40 | 0.43 | 0.51 | 0.67 | 0.49 | 0.57 | 0.25 | 0.93 | 0.77 | 0.36 | 0.55 | 0.74 | 0.67 | 0.53 | 0.52 | 0.64 | 1 | 0.10 | 0.15 | 0.16 | 0.04 | -0.43 | 0.39 | 0.11 |
| leukocyte | 0.97 | 0.80 | 0.72 | 0.72 | 0.74 | 0.82 | 0.71 | 0.27 | 0.52 | 0.98 | 0.91 | 0.26 | 0.59 | 0.36 | 0.18 | 0.84 | 0.65 | 0.91 | 0.75 | 0.64 | 0.63 | 1 | 0.97 | 0.54 | 0.17 | 0.05 | 0.13 | 0.29 |
| neutrophil | 0.75 | 0.89 | 0.79 | 0.65 | 0.87 | 0.97 | 0.69 | 0.29 | 0.71 | 0.97 | 0.90 | 0.36 | 0.53 | 0.20 | 0.23 | 0.93 | 0.63 | 0.51 | 1.00 | 0.68 | 0.48 | 0.00 | 1 | 0.49 | 0.11 | 0.07 | 0.22 | 0.25 |
| lymphocyte | 0.35 | 0.82 | 0.29 | 0.10 | 0.78 | 0.82 | 0.45 | 0.60 | 0.35 | 0.23 | 0.45 | 0.86 | 0.78 | 0.05 | 0.30 | 0.41 | 0.85 | 0.93 | 0.48 | 0.27 | 0.43 | 0.00 | 0.01 | 1 | 0.20 | 0.05 | -0.04 | 0.34 |
| platet | 0.56 | 0.70 | 0.29 | 0.12 | 0.59 | 0.81 | 0.67 | 0.62 | 0.77 | 0.85 | 0.92 | 0.40 | 0.40 | 0.98 | 0.68 | 0.33 | 0.55 | 0.32 | 0.24 | 0.53 | 0.84 | 0.42 | 0.58 | 0.33 | 1 | 0.24 | -0.28 | 0.08 |
| creatinine | 0.43 | 0.27 | 0.08 | 0.15 | 0.45 | 0.29 | 0.10 | 0.32 | 0.57 | 0.04 | 0.04 | 0.84 | 0.89 | 0.63 | 0.58 | 0.04 | 1.00 | 0.23 | 0.09 | 0.16 | 0.03 | 0.80 | 0.73 | 0.82 | 0.24 | 1 | -0.45 | 0.04 |
| bilirubin | 0.71 | 0.63 | 0.35 | 0.76 | 0.22 | 0.99 | 0.81 | 0.42 | 0.75 | 0.49 | 0.15 | 0.60 | 0.78 | 0.35 | 0.89 | 0.34 | 0.92 | 0.42 | 0.15 | 0.64 | 0.09 | 0.57 | 0.36 | 0.88 | 0.24 | 0.05 | 1 | 0.09 |
| PaO ₂ /FiO ₂ | 0.42 | 0.04 | 0.39 | 0.20 | 0.57 | 0.83 | 0.95 | 0.25 | 0.18 | 0.38 | 1.00 | 0.59 | 0.55 | 0.67 | 0.08 | 0.48 | 0.93 | 0.27 | 0.50 | 0.53 | 0.60 | 0.15 | 0.22 | 0.09 | 0.69 | 0.84 | 0.72 | 1 |

Spearman rank correlation test was used for statistical analysis. Statistically significant was considered $p < 0.05$.

Abbreviations: CRP, C-reactive protein; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN- γ , interferon γ ; IL, interleukin; SOFA, Sequential Organ Failure Assessment; PaO₂/FiO₂, arterial oxygen partial pressure/ fractional inspired oxygen; TNF, tumor necrosis factor.

Acknowledgements: We thank all study participants and their legal representatives who kindly allowed the collection of samples and data. We also thank Hospital das Clínicas, Department of Medicine and Department of Biochemistry and Immunology of the Federal University of Minas Ministry of Education (SESU-MEC), the National Institute of Science and Technology in Vaccines (CT-Vacinas), and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for funding.

Funding information: Ministério da Educação (SESU-MEC – Public notice “Fighting COVID-19”), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Vacinas and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Author contributions: LS, MHGP, CGR, PFV, HCS e VN conceived the project. CPR, PVF, LS e MHGP recruited study participants. LS, MHGP, MSV, CGR, PFV, RSC, PPCP, and MVMA performed clinical evaluation and follow up and performed laboratory experiments. LS, MHGP, HCS and VN analyzed the data. LS, HCS and VN wrote the manuscript. All authors reviewed and approved the manuscript.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Jonhs Hopkins University. COVID-19 Dashboard. Available at: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>. Accessed March, 2023.
2. Arish M, Qian W, Narasimhan H, Sun J. COVID-19 immunopathology: From acute diseases to chronic sequelae. *J Med Virol* **2023**; 95:e28122.
3. Gupta A, Madhavan MV, Sehgal K, et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat Med* **2020**; 26:1017-32.
4. Galani IE, Rovina N, Lampropoulou V, et al. Untuned antiviral immunity in COVID-19 revealed by temporal type I/III interferon patterns and flu comparison. *Nat Immunol* **2021**; 22:32-40.
5. Hu H, Pan H, Li R, He K, Zhang H, Liu L. Increased Circulating Cytokines Have a Role in COVID-19 Severity and Death With a More Pronounced Effect in Males: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Pharmacol* **2022**; 13:802228.
6. Lucas C, Wong P, Klein J, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature* **2020**; 584:463-9.
7. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* **2020**; 395:497-506.
8. Chen LD, Zhang ZY, Wei XJ, et al. Association between cytokine profiles and lung injury in COVID-

- 19 pneumonia. *Respir Res* **2020**; 21:201.
9. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med* **2020**; 26:1636-43.
10. Xiong Y, Liu Y, Cao L, et al. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect* **2020**; 9:761-70.
11. Pandolfi L, Fossali T, Frangipane V, et al. Broncho-alveolar inflammation in COVID-19 patients: a correlation with clinical outcome. *BMC Pulm Med* **2020**; 20:301.
12. Reynolds D, Vazquez Guillamet C, Day A, et al. Comprehensive Immunologic Evaluation of Bronchoalveolar Lavage Samples from Human Patients with Moderate and Severe Seasonal Influenza and Severe COVID-19. *J Immunol* **2021**; 207:1229-38.
13. Zaid Y, Dore E, Dubuc I, et al. Chemokines and eicosanoids fuel the hyperinflammation within the lungs of patients with severe COVID-19. *J Allergy Clin Immunol* **2021**; 148:368-80 e3.
14. Wu D, Yang XO. Dysregulation of Pulmonary Responses in Severe COVID-19. *Viruses* **2021**; 13.
15. Chang Y, Bai M, You Q. Associations between Serum Interleukins (IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, and IL-10) and Disease Severity of COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int* **2022**; 2022:2755246.
16. Rice TW, Wheeler AP, Bernard GR, et al. Comparison of the SpO₂/FIO₂ ratio and the PaO₂/FIO₂ ratio in patients with acute lung injury or ARDS. *Chest* **2007**; 132:410-7.
17. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* **2012**; 307:2526-33.
18. Guerin C, Reignier J, Richard JC, et al. Prone positioning in severe acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* **2013**; 368:2159-68.
19. Quah P, Li A, Phua J. Mortality rates of patients with COVID-19 in the intensive care unit: a systematic review of the emerging literature. *Crit Care* **2020**; 24:285.
20. Jimenez D, Torres Arias M. Immunouniverse of SARS-CoV-2. *Immunol Med* **2022**; 45:186-224.
21. Jontvedt Jorgensen M, Holter JC, Christensen EE, et al. Increased interleukin-6 and macrophage chemoattractant protein-1 are associated with respiratory failure in COVID-19. *Sci Rep* **2020**; 10:21697.
22. Unterman A, Sumida TS, Nouri N, et al. Single-cell multi-omics reveals dyssynchrony of the innate and adaptive immune system in progressive COVID-19. *Nat Commun* **2022**; 13:440.
23. Paidas MJ, Sampath N, Schindler EA, et al. Mechanism of Multi-Organ Injury in Experimental COVID-19 and Its Inhibition by a Small Molecule Peptide. *Front Pharmacol* **2022**; 13:864798.
24. Queiroz MAF, Neves P, Lima SS, et al. Cytokine Profiles Associated With Acute COVID-19 and Long COVID-19 Syndrome. *Front Cell Infect Microbiol* **2022**; 12:922422.
25. Korobova ZR, Arsentieva NA, Liubimova NE, et al. A Comparative Study of the Plasma Chemokine Profile in COVID-19 Patients Infected with Different SARS-CoV-2 Variants. *Int J Mol Sci* **2022**; 23.
26. Kesmez Can F, Ozkurt Z, Ozturk N, Sezen S. Effect of IL-6, IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL 10 levels

on the severity in COVID 19 infection. *Int J Clin Pract* **2021**; 75:e14970.

27. Grant RA, Morales-Nebreda L, Markov NS, et al. Circuits between infected macrophages and T cells in SARS-CoV-2 pneumonia. *Nature* **2021**; 590:635-41.

28. Liao M, Liu Y, Yuan J, et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat Med* **2020**; 26:842-4.

29. Arifa RDN, Goncalves-Pereira MH, Santiago L, et al. Reduction in the number of neutrophils in the broncho-alveolar aspirate is associated with worse prognosis in elderly patients with severe COVID-19. *Inflamm Res* **2023**:1-4.

30. Singh G, Martin Rumende C, Sharma SK, et al. Low BALF CD4 T cells count is associated with extubation failure and mortality in critically ill covid-19 pneumonia. *Ann Med* **2022**; 54:1894-905.

31. Yang L, Gou J, Gao J, Huang L, Zhu Z, Ji S, Liu H, Xing L, Yao M, Zhang Y. Immune characteristics of severe and critical COVID-19 patients. *Signal Transduct Target Ther.* **2020** Aug 31;5(1):179. doi: 10.1038/s41392-020-00296-3.

32. Zizzo G, Tamburello A, Castelnovo L, et al. Immunotherapy of COVID-19: Inside and Beyond IL-6 Signalling. *Front Immunol* **2022**; 13:795315.

33. National Institutes of Health. COVID-19 Treatment Guidelines Panel. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. Available at: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>. Accessed January 2023.

34. Goncalves-Pereira MH, Santiago L, Ravetti CG, et al. Dysfunctional phenotype of systemic and pulmonary regulatory T cells associate with lethal COVID-19 cases. *Immunology* **2023**; 168:684-96.

35. Kollef MH, Bock KR, Richards RD, Hearn ML. The safety and diagnostic accuracy of minibronchoalveolar lavage in patients with suspected ventilator-associated pneumonia. *Ann Intern Med* **1995**; 122:743-8.

36. Erden V, Basaranoglu G, Beycan I, Delatioglu H, Hamzaoglu NS. Reproducibility of mini-BAL culture results using 10 ml or 20 ml instilled fluid. *Intensive Care Med* **2003**; 29:1856.

37. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* **1996**; 154:308-17.

CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS

A pesquisa realizada não se limitou apenas ao manuscrito apresentado acima, uma vez que a coleta de amostras de mini-BAL, sangue periférico, dados clínicos e laboratoriais, bem como a análise da mecânica respiratória, possibilitaram outras investigações adicionais.

Essa dissertação tem como foco principal a produção do artigo intitulado “Compartmentalized regulation of pulmonary and systemic inflammation in critical COVID-19 patients”.

Estudos sobre as células T reguladoras e os neutrófilos nos sítios pulmonares e sistêmicos resultaram na publicação dos seguintes artigos:

- Gonçalves-Pereira MH*, Santiago L*, Ravetti CG, Vassallo PF, de Andrade MVM, Vieira MS, de Fátima Souza de Oliveira F, Carobin NV, Li G, de Paula Sabino A, Nobre V, da Costa Santiago H. Dysfunctional phenotype of systemic and pulmonary regulatory T cells associate with lethal COVID-19 cases. *Immunology*. 2023 Apr;168(4):684-696. doi: 10.1111/imm.13603.

- Arifa RDN*, Gonçalves-Pereira MH*, Santiago L, Ravetti CG, Vassallo PF, de Fátima Souza Oliveira F, de Paula Sabino A, Teixeira MM, Nobre V, da Costa Santiago H*, Souza DG*. Reduction in the number of neutrophils in the broncho-alveolar aspirate is associated with worse prognosis in elderly patients with severe COVID-19. *Inflamm Res*. 2023 Mar 29:1–4. doi: 10.1007/s00011-023-01726-y.

Atualmente ainda estão em andamento análises sobre linfócitos imune inatos e monócitos, além da mecânica pulmonar na COVID-19 com base nos dados coletados. A colaboração com outros pesquisadores foi fundamental para ampliar a pesquisa e o entendimento sobre o SARS-CoV-2, permitindo a produção de conhecimento que possibilite um melhor manejo da COVID-19.

REFERÊNCIAS

- AMRAEI, R.; YIN, W.; NAPOLEON, M. A.; SUDER, E. L.; BERRIGAN, J.; ZHAO, Q.; OLEJNIK, J.; CHANDLER, K. B.; XIA, C.; FELDMAN, J.; HAUSER, B. M.; CARADONNA, T. M.; SCHMIDT, A. G.; GUMMULURU, S.; MUHLBERGER, E.; CHITALIA, V.; COSTELLO, C. E.; RAHIMI, N. CD209L/L-SIGN and CD209/DC-SIGN act as receptors for SARS-CoV-2. **bioRxiv**, Jun 14 2021.
- ARIFA, R. D. N.; GONCALVES-PEREIRA, M. H.; SANTIAGO, L.; RAVETTI, C. G.; VASSALLO, P. F.; DE FATIMA SOUZA OLIVEIRA, F.; DE PAULA SABINO, A.; TEIXEIRA, M. M.; NOBRE, V.; DA COSTA SANTIAGO, H.; SOUZA, D. G. Reduction in the number of neutrophils in the broncho-alveolar aspirate is associated with worse prognosis in elderly patients with severe COVID-19. **Inflamm Res**, p. 1-4, Mar 29 2023.
- ARISH, M.; QIAN, W.; NARASIMHAN, H.; SUN, J. COVID-19 immunopathology: From acute diseases to chronic sequelae. **J Med Virol**, v. 95, n. 1, p. e28122, Jan 2023.
- BALDELLI, L.; MARJOT, T.; BARNES, E.; BARRITT, A. S.; WEBB, G. J.; MOON, A. M. SARS-CoV-2 Infection and Liver Disease: A Review of Pathogenesis and Outcomes. **Gut Liver**, v. 17, n. 1, p. 12-23, Jan 15 2023.
- BALZANELLI, M. G.; DISTRATIS, P.; AITYAN, S. K.; AMATULLI, F.; CATUCCI, O.; CEFALO, A.; DE MICHELE, A.; DIPALMA, G.; INCHINGOLO, F.; LAZZARO, R.; NGUYEN, K. C. D.; PALAZZO, D.; TAMPOIA, M.; PHAM, V. H.; SANTACROCE, L.; ISACCO, C. G. An Alternative "Trojan Horse" Hypothesis for COVID-19: Immune Deficiency of IL-10 and SARS-CoV-2 Biology. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**, v. 22, n. 1, p. 1-5, 2022.
- BHOLA, S.; TRISAL, J.; THAKUR, V.; KAUR, P.; KULSHRESTHA, S.; BHATIA, S. K.; KUMAR, P. Neurological toll of COVID-19. **Neurol Sci**, v. 43, n. 4, p. 2171-2186, Apr 2022.
- BLOT, M.; JACQUIER, M.; AHO GLELE, L. S.; BELTRAMO, G.; NGUYEN, M.; BONNIAUD, P.; PRIN, S.; ANDREU, P.; BOUHEMAD, B.; BOUR, J. B.; BINQUET, C.; PIROTH, L.; PAIS DE BARROS, J. P.; MASSON, D.; QUENOT, J. P.; CHARLES, P. E.; PNEUMOCHONDRIE STUDY, G. CXCL10 could drive longer duration of mechanical ventilation during COVID-19 ARDS. **Crit Care**, v. 24, n. 1, p. 632, Nov 2 2020.
- BRISCOE, J.; GUSCHIN, D.; ROGERS, N. C.; WATLING, D.; MULLER, M.; HORN, F.; HEINRICH, P.; STARK, G. R.; KERR, I. M. JAKs, STATs and signal transduction in response to the interferons and other cytokines. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 351, n. 1336, p. 167-71, Feb 29 1996.
- CANTUTI-CASTELVETRI, L.; OJHA, R.; PEDRO, L. D.; DJANNATIAN, M.; FRANZ, J.; KUIVANEN, S.; VAN DER MEER, F.; KALLIO, K.; KAYA, T.; ANASTASINA, M.; SMURA, T.; LEVANOVA, L.; SZIROVICZA, L.; TOBI, A.; KALLIO-KOKKO, H.; OSTERLUND, P.; JOENSUU, M.; MEUNIER, F. A.; BUTCHER, S. J.; WINKLER, M. S.; MOLLENHAUER, B.; HELENIUS, A.; GOKCE, O.; TEESALU, T.; HEPOJOKI, J.; VAPALAHTI, O.; STADELMANN, C.; BALISTRERI, G.; SIMONS, M. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. **Science**, v. 370, n. 6518, p. 856-860, Nov 13 2020.
- CARLOS, A. J.; HA, D. P.; YEH, D. W.; VAN KRIEKEN, R.; TSENG, C. C.; ZHANG, P.; GILL, P.; MACHIDA, K.; LEE, A. S. The chaperone GRP78 is a host auxiliary factor for SARS-CoV-2 and GRP78 depleting antibody blocks viral entry and infection. **J Biol Chem**, v. 296, p. 100759, Jan-Jun 2021.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention. SARS-CoV-2 variant classifications and definitions. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>.

Accessed February 19, 2023.

CHANG, Y.; BAI, M.; YOU, Q. Associations between Serum Interleukins (IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, and IL-10) and Disease Severity of COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Biomed Res Int**, v. 2022, p. 2755246, 2022.

CHEN, L. D.; ZHANG, Z. Y.; WEI, X. J.; CAI, Y. Q.; YAO, W. Z.; WANG, M. H.; HUANG, Q. F.; ZHANG, X. B. Association between cytokine profiles and lung injury in COVID-19 pneumonia. **Respir Res**, v. 21, n. 1, p. 201, Jul 29 2020.

CHEN, T. H.; HSU, M. T.; LEE, M. Y.; CHOU, C. K. Gastrointestinal Involvement in SARS-CoV-2 Infection. **Viruses**, v. 14, n. 6, May 30 2022.

CHUA, R. L.; LUKASSEN, S.; TRUMP, S.; HENNIG, B. P.; WENDISCH, D.; POTT, F.; DEBNATH, O.; THURMANN, L.; KURTH, F.; VOLKER, M. T.; KAZMIERSKI, J.; TIMMERMANN, B.; TWARDZIOK, S.; SCHNEIDER, S.; MACHLEIDT, F.; MULLER-REDEZKY, H.; MAIER, M.; KRANNICH, A.; SCHMIDT, S.; BALZER, F.; LIEBIG, J.; LOSKE, J.; SUTTORP, N.; EILS, J.; ISHAQUE, N.; LIEBERT, U. G.; VON KALLE, C.; HOCKE, A.; WITZENRATH, M.; GOFFINET, C.; DROSTEN, C.; LAUDI, S.; LEHMANN, I.; CONRAD, C.; SANDER, L. E.; EILS, R. COVID-19 severity correlates with airway epithelium-immune cell interactions identified by single-cell analysis. **Nat Biotechnol**, v. 38, n. 8, p. 970-979, Aug 2020.

CLAUSEN, T. M.; SANDOVAL, D. R.; SPLIID, C. B.; PIHL, J.; PERRETT, H. R.; PAINTER, C. D.; NARAYANAN, A.; MAJOWICZ, S. A.; KWONG, E. M.; MCVICAR, R. N.; THACKER, B. E.; GLASS, C. A.; YANG, Z.; TORRES, J. L.; GOLDEN, G. J.; BARTELS, P. L.; PORELL, R. N.; GARRETSON, A. F.; LAUBACH, L.; FELDMAN, J.; YIN, X.; PU, Y.; HAUSER, B. M.; CARADONNA, T. M.; KELLMAN, B. P.; MARTINO, C.; GORDTS, P.; CHANDA, S. K.; SCHMIDT, A. G.; GODULA, K.; LEIBEL, S. L.; JOSE, J.; CORBETT, K. D.; WARD, A. B.; CARLIN, A. F.; ESKO, J. D. SARS-CoV-2 Infection Depends on Cellular Heparan Sulfate and ACE2. **Cell**, v. 183, n. 4, p. 1043-1057 e15, Nov 12 2020.

CLEMENTI, N.; GHOSH, S.; DE SANTIS, M.; CASTELLI, M.; CRISCUOLO, E.; ZANONI, I.; CLEMENTI, M.; MANCINI, N. Viral Respiratory Pathogens and Lung Injury. **Clin Microbiol Rev**, v. 34, n. 3, Jun 16 2021.

DALY, J. L.; SIMONETTI, B.; KLEIN, K.; CHEN, K. E.; WILLIAMSON, M. K.; ANTON-PLAGARO, C.; SHOEMARK, D. K.; SIMON-GRACIA, L.; BAUER, M.; HOLLANDI, R.; GREBER, U. F.; HORVATH, P.; SESSIONS, R. B.; HELENIUS, A.; HISCOX, J. A.; TEESALU, T.; MATTHEWS, D. A.; DAVIDSON, A. D.; COLLINS, B. M.; CULLEN, P. J.; YAMAUCHI, Y. Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. **Science**, v. 370, n. 6518, p. 861-865, Nov 13 2020.

DEL VALLE, D. M.; KIM-SCHULZE, S.; HUANG, H. H.; BECKMANN, N. D.; NIRENBERG, S.; WANG, B.; LAVIN, Y.; SWARTZ, T. H.; MADDURI, D.; STOCK, A.; MARRON, T. U.; XIE, H.; PATEL, M.; TUBALLES, K.; VAN OEKELEN, O.; RAHMAN, A.; KOVATCH, P.; ABERG, J. A.; SCHADT, E.; JAGANNATH, S.; MAZUMDAR, M.; CHARNEY, A. W.; FIRPO-BETANCOURT, A.; MENDU, D. R.; JHANG, J.; REICH, D.; SIGEL, K.; CORDON-CARDO, C.; FELDMANN, M.; PAREKH, S.; MERAD, M.; GNJATIC, S. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. **Nat Med**, v. 26, n. 10, p. 1636-1643, Oct 2020.

DENG, G.; YIN, M.; CHEN, X.; ZENG, F. Clinical determinants for fatality of 44,672 patients with COVID-19. **Crit Care**, v. 24, n. 1, p. 179, Apr 28 2020.

DIAMOND, M. S.; KANNEGANTI, T. D. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. **Nat Immunol**, v. 23, n. 2, p. 165-176, Feb 2022.

ELROBAA, I. H.; NEW, K. J. COVID-19: Pulmonary and Extra Pulmonary Manifestations. **Front Public Health**, v. 9, p. 711616, 2021.

ERDEN, V.; BASARANOGLU, G.; BEYCAN, I.; DELATIOGLU, H.; HAMZAOGLU, N. S. Reproducibility of mini-BAL culture results using 10 ml or 20 ml instilled fluid. **Intensive Care Med**, v. 29, n. 10, p. 1856, Oct 2003.

FENSTERL, V.; SEN, G. C. Interferons and viral infections. **Biofactors**, v. 35, n. 1, p. 14-20, Jan-Feb 2009.

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. Untuned antiviral immunity in COVID-19 revealed by temporal type I/III interferon patterns and flu comparison. **Nat Immunol**, v. 22, n. 1, p. 32-40, Jan 2021.

GONCALVES-PEREIRA, M. H.; SANTIAGO, L.; RAVETTI, C. G.; VASSALLO, P. F.; DE ANDRADE, M. V. M.; VIEIRA, M. S.; DE FATIMA SOUZA DE OLIVEIRA, F.; CAROBIN, N. V.; LI, G.; DE PAULA SABINO, A.; NOBRE, V.; DA COSTA SANTIAGO, H. Dysfunctional phenotype of systemic and pulmonary regulatory T cells associate with lethal COVID-19 cases. **Immunology**, v. 168, n. 4, p. 684-696, Apr 2023.

GRANT, R. A.; MORALES-NEBREDA, L.; MARKOV, N. S.; SWAMINATHAN, S.; QUERREY, M.; GUZMAN, E. R.; ABBOTT, D. A.; DONNELLY, H. K.; DONAYRE, A.; GOLDBERG, I. A.; KLUG, Z. M.; BORKOWSKI, N.; LU, Z.; KIHSHEN, H.; POLITANSKA, Y.; SICHIZYA, L.; KANG, M.; SHILATIFARD, A.; QI, C.; LOMASNEY, J. W.; ARGENTO, A. C.; KRUSER, J. M.; MALSIN, E. S.; PICKENS, C. O.; SMITH, S. B.; WALTER, J. M.; PAWLOWSKI, A. E.; SCHNEIDER, D.; NANNAPANENI, P.; ABDALA-VALENCIA, H.; BHARAT, A.; GOTTARDI, C. J.; BUDINGER, G. R. S.; MISHARIN, A. V.; SINGER, B. D.; WUNDERINK, R. G.; INVESTIGATORS, N. S. S. Circuits between infected macrophages and T cells in SARS-CoV-2 pneumonia. **Nature**, v. 590, n. 7847, p. 635-641, Feb 2021.

GRASSELLI, G.; GRECO, M.; ZANELLA, A.; ALBANO, G.; ANTONELLI, M.; BELLANI, G.; BONANOMI, E.; CABRINI, L.; CARLESSO, E.; CASTELLI, G.; CATTANEO, S.; CEREDA, D.; COLOMBO, S.; COLUCCELLO, A.; CRESCINI, G.; FORASTIERI MOLINARI, A.; FOTI, G.; FUMAGALLI, R.; IOTTI, G. A.; LANGER, T.; LATRONICO, N.; LORINI, F. L.; MOJOLI, F.; NATALINI, G.; PESSINA, C. M.; RANIERI, V. M.; RECH, R.; SCUDELLER, L.; ROSANO, A.; STORTI, E.; THOMPSON, B. T.; TIRANI, M.; VILLANI, P. G.; PESENTI, A.; CECCONI, M.; NETWORK, C.-L. I. Risk Factors Associated With Mortality Among Patients With COVID-19 in Intensive Care Units in Lombardy, Italy. **JAMA Intern Med**, v. 180, n. 10, p. 1345-1355, Oct 1 2020.

RECOVERY Collaborative Group. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. **Lancet**, v. 397, n. 10285, p. 1637-1645, May 1 2021.

RECOVERY Collaborative Group. Baricitinib in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial and updated meta-analysis. **Lancet**, v. 400, n. 10349, p. 359-368, Jul 30 2022.

GUSEV, E.; SARAPULTSEV, A.; SOLOMATINA, L.; CHERESHNEV, V. SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. **Int J Mol Sci**, v. 23, n. 3, Feb 2 2022.

HADJADJ, J.; YATIM, N.; BARNABEL, L.; CORNEAU, A.; BOUSSIER, J.; SMITH, N.; PERE, H.; CHARBIT, B.; BONDET, V.; CHENEVIER-GOBEAUX, C.; BREILLAT, P.; CARLIER, N.;

GAUZIT, R.; MORBIEU, C.; PENE, F.; MARIN, N.; ROCHE, N.; SZWEBEL, T. A.; MERKLING, S. H.; TRELUYER, J. M.; VEYER, D.; MOUTHON, L.; BLANC, C.; THARAUX, P. L.; ROZENBERG, F.; FISCHER, A.; DUFFY, D.; RIEUX-LAUCAT, F.; KERNEIS, S.; TERRIER, B. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. **Science**, v. 369, n. 6504, p. 718-724, Aug 7 2020.

COVID-19 Treatment Guidelines Panel. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. National Institutes of Health. Available at <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>. Accessed April 12, 2023.

HIKMET, F.; MEAR, L.; EDVINSSON, A.; MICKE, P.; UHLEN, M.; LINDSKOG, C. The protein expression profile of ACE2 in human tissues. **Mol Syst Biol**, v. 16, n. 7, p. e9610, Jul 2020.

HOFFMANN, M.; KLEINE-WEBER, H.; SCHROEDER, S.; KRUGER, N.; HERRLER, T.; ERICHSEN, S.; SCHIERGENS, T. S.; HERRLER, G.; WU, N. H.; NITSCHKE, A.; MULLER, M. A.; DROSTEN, C.; POHLMANN, S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271-280 e8, Apr 16 2020.

HU, H.; PAN, H.; LI, R.; HE, K.; ZHANG, H.; LIU, L. Increased Circulating Cytokines Have a Role in COVID-19 Severity and Death With a More Pronounced Effect in Males: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Front Pharmacol**, v. 13, p. 802228, 2022.

HU, Y.; LI, W.; GAO, T.; CUI, Y.; JIN, Y.; LI, P.; MA, Q.; LIU, X.; CAO, C. Correction for Hu et al., "The Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nucleocapsid Inhibits Type I Interferon Production by Interfering with TRIM25-Mediated RIG-I Ubiquitination". **J Virol**, v. 94, n. 20, Sep 29 2020.

HUANG, C.; WANG, Y.; LI, X.; REN, L.; ZHAO, J.; HU, Y.; ZHANG, L.; FAN, G.; XU, J.; GU, X.; CHENG, Z.; YU, T.; XIA, J.; WEI, Y.; WU, W.; XIE, X.; YIN, W.; LI, H.; LIU, M.; XIAO, Y.; GAO, H.; GUO, L.; XIE, J.; WANG, G.; JIANG, R.; GAO, Z.; JIN, Q.; WANG, J.; CAO, B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497-506, Feb 15 2020.

HUANG, Y. K.; LI, Y. J.; LI, B.; WANG, P.; WANG, Q. H. Dysregulated liver function in SARS-CoV-2 infection: Current understanding and perspectives. **World J Gastroenterol**, v. 27, n. 27, p. 4358-4370, Jul 21 2021.

HUGHES, C. E.; NIBBS, R. J. B. A guide to chemokines and their receptors. **FEBS J**, v. 285, n. 16, p. 2944-2971, Aug 2018.

JAIMES, J. A.; MILLET, J. K.; WHITTAKER, G. R. Proteolytic Cleavage of the SARS-CoV-2 Spike Protein and the Role of the Novel S1/S2 Site. **iScience**, v. 23, n. 6, p. 101212, Jun 26 2020.

KHALIL, B. A.; ELEMAM, N. M.; MAGHAZACHI, A. A. Chemokines and chemokine receptors during COVID-19 infection. **Comput Struct Biotechnol J**, v. 19, p. 976-988, 2021.

KNAUS, W. A.; DRAPER, E. A.; WAGNER, D. P.; ZIMMERMAN, J. E. APACHE II: a severity of disease classification system. **Crit Care Med**, v. 13, n. 10, p. 818-29, Oct 1985.

KOLLEF, M. H.; BOCK, K. R.; RICHARDS, R. D.; HEARNS, M. L. The safety and diagnostic accuracy of minibronchoalveolar lavage in patients with suspected ventilator-associated pneumonia. **Ann Intern Med**, v. 122, n. 10, p. 743-8, May 15 1995.

KOX, M.; WAALDERS, N. J. B.; KOOISTRA, E. J.; GERRETSEN, J.; PICKKERS, P. Cytokine Levels in Critically Ill Patients With COVID-19 and Other Conditions. **JAMA**, v. 324, n. 15, p. 1565-

7, Sep 3 2020.

LAMERS, M. M.; HAAGMANS, B. L. SARS-CoV-2 pathogenesis. **Nat Rev Microbiol**, v. 20, n. 5, p. 270-284, May 2022.

LAUER, S. A.; GRANTZ, K. H.; BI, Q.; JONES, F. K.; ZHENG, Q.; MEREDITH, H. R.; AZMAN, A. S.; REICH, N. G.; LESSLER, J. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. **Ann Intern Med**, v. 172, n. 9, p. 577-582, May 5 2020.

LE, Y.; ZHOU, Y.; IRIBARREN, P.; WANG, J. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. **Cell Mol Immunol**, v. 1, n. 2, p. 95-104, Apr 2004.

LEISMAN, D. E.; RONNER, L.; PINOTTI, R.; TAYLOR, M. D.; SINHA, P.; CALFEE, C. S.; HIRAYAMA, A. V.; MASTROIANI, F.; TURTLE, C. J.; HARHAY, M. O.; LEGRAND, M.; DEUTSCHMAN, C. S. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. **Lancet Respir Med**, v. 8, n. 12, p. 1233-1244, Dec 2020.

LI, Q.; WANG, Y.; SUN, Q.; KNOPF, J.; HERRMANN, M.; LIN, L.; JIANG, J.; SHAO, C.; LI, P.; HE, X.; HUA, F.; NIU, Z.; MA, C.; ZHU, Y.; IPPOLITO, G.; PIACENTINI, M.; ESTAQUIER, J.; MELINO, S.; WEISS, F. D.; ANDREANO, E.; LATZ, E.; SCHULTZE, J. L.; RAPPUOLI, R.; MANTOVANI, A.; MAK, T. W.; MELINO, G.; SHI, Y. Immune response in COVID-19: what is next? **Cell Death Differ**, v. 29, n. 6, p. 1107-1122, Jun 2022.

LIAO, M.; LIU, Y.; YUAN, J.; WEN, Y.; XU, G.; ZHAO, J.; CHENG, L.; LI, J.; WANG, X.; WANG, F.; LIU, L.; AMIT, I.; ZHANG, S.; ZHANG, Z. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. **Nat Med**, v. 26, n. 6, p. 842-844, Jun 2020.

LIU, P. P.; BLET, A.; SMYTH, D.; LI, H. The Science Underlying COVID-19: Implications for the Cardiovascular System. **Circulation**, v. 142, n. 1, p. 68-78, Jul 7 2020.

LOWERY, S. A.; SARIOL, A.; PERLMAN, S. Innate immune and inflammatory responses to SARS-CoV-2: Implications for COVID-19. **Cell Host Microbe**, v. 29, n. 7, p. 1052-1062, Jul 14 2021.

LUCAS, C.; WONG, P.; KLEIN, J.; CASTRO, T. B. R.; SILVA, J.; SUNDARAM, M.; ELLINGSON, M. K.; MAO, T.; OH, J. E.; ISRAELOW, B.; TAKAHASHI, T.; TOKUYAMA, M.; LU, P.; VENKATARAMAN, A.; PARK, A.; MOHANTY, S.; WANG, H.; WYLLIE, A. L.; VOGELS, C. B. F.; EARNEST, R.; LAPIDUS, S.; OTT, I. M.; MOORE, A. J.; MUENKER, M. C.; FOURNIER, J. B.; CAMPBELL, M.; ODIO, C. D.; CASANOVAS-MASSANA, A.; YALE, I. T.; HERBST, R.; SHAW, A. C.; MEDZHITOV, R.; SCHULZ, W. L.; GRUBAUGH, N. D.; DELA CRUZ, C.; FARHADIAN, S.; KO, A. I.; OMER, S. B.; IWASAKI, A. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 463-469, Aug 2020.

MADDEN, E. A.; DIAMOND, M. S. Host cell-intrinsic innate immune recognition of SARS-CoV-2. **Curr Opin Virol**, v. 52, p. 30-38, Feb 2022.

MADJID, M.; SAFAVI-NAEINI, P.; SOLOMON, S. D.; VARDENY, O. Potential Effects of Coronaviruses on the Cardiovascular System: A Review. **JAMA Cardiol**, v. 5, n. 7, p. 831-840, Jul 1 2020.

MERAD, M.; BLISH, C. A.; SALLUSTO, F.; IWASAKI, A. The immunology and immunopathology of COVID-19. **Science**, v. 375, n. 6585, p. 1122-1127, Mar 11 2022.

MONK, P. D.; MARSDEN, R. J.; TEAR, V. J.; BROOKES, J.; BATTEN, T. N.; MANKOWSKI, M.;

GABBAY, F. J.; DAVIES, D. E.; HOLGATE, S. T.; HO, L. P.; CLARK, T.; DJUKANOVIC, R.; WILKINSON, T. M. A.; INHALED INTERFERON BETA, C.-S. G. Safety and efficacy of inhaled nebulised interferon beta-1a (SNG001) for treatment of SARS-CoV-2 infection: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. **Lancet Respir Med**, v. 9, n. 2, p. 196-206, Feb 2021.

MURPHY, P. M.; BAGGIOLINI, M.; CHARO, I. F.; HEBERT, C. A.; HORUK, R.; MATSUSHIMA, K.; MILLER, L. H.; OPPENHEIM, J. J.; POWER, C. A. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. **Pharmacol Rev**, v. 52, n. 1, p. 145-76, Mar 2000.

PALAIODIMOS, L.; KOKKINIDIS, D. G.; LI, W.; KARAMANIS, D.; OGNIBENE, J.; ARORA, S.; SOUTHERN, W. N.; MANTZOROS, C. S. Severe obesity, increasing age and male sex are independently associated with worse in-hospital outcomes, and higher in-hospital mortality, in a cohort of patients with COVID-19 in the Bronx, New York. **Metabolism**, v. 108, p. 154262, Jul 2020.

PALOMINO, D. C.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 13, n. 3, p. 469-73, Jul-Sep 2015.

PANDOLFI, L.; FOSSALI, T.; FRANGIPANE, V.; BOZZINI, S.; MOROSINI, M.; D'AMATO, M.; LETTIERI, S.; URTIS, M.; DI TORO, A.; SARACINO, L.; PERCIVALLE, E.; TOMASELLI, S.; CAVAGNA, L.; COVA, E.; MOJOLI, F.; BERGOMI, P.; OTTOLINA, D.; LILLERI, D.; CORSICO, A. G.; ARBUSTINI, E.; COLOMBO, R.; MELONI, F. Broncho-alveolar inflammation in COVID-19 patients: a correlation with clinical outcome. **BMC Pulm Med**, v. 20, n. 1, p. 301, Nov 16 2020.

PEI, G.; ZHANG, Z.; PENG, J.; LIU, L.; ZHANG, C.; YU, C.; MA, Z.; HUANG, Y.; LIU, W.; YAO, Y.; ZENG, R.; XU, G. Renal Involvement and Early Prognosis in Patients with COVID-19 Pneumonia. **J Am Soc Nephrol**, v. 31, n. 6, p. 1157-1165, Jun 2020.

PIZZICHINI, E.; PIZZICHINI, M. M.; EFTHIMIADIS, A.; EVANS, S.; MORRIS, M. M.; SQUILLACE, D.; GLEICH, G. J.; DOLOVICH, J.; HARGREAVE, F. E. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 154, n. 2 Pt 1, p. 308-17, Aug 1996.

QUEIROZ, M. A. F.; NEVES, P.; LIMA, S. S.; LOPES, J. D. C.; TORRES, M.; VALLINOTO, I.; BICHARA, C. D. A.; DOS SANTOS, E. F.; DE BRITO, M.; DA SILVA, A. L. S.; LEITE, M. M.; DA COSTA, F. P.; VIANA, M.; RODRIGUES, F. B. B.; DE SARGES, K. M. L.; CANTANHEDE, M. H. D.; DA SILVA, R.; BICHARA, C. N. C.; VAN DEN BERG, A. V. S.; VERISSIMO, A. O. L.; CARVALHO, M. D. S.; HENRIQUES, D. F.; DOS SANTOS, C. P.; NUNES, J. A. L.; COSTA, I. B.; VIANA, G. M. R.; CARNEIRO, F. R. O.; PALACIOS, V.; QUARESMA, J. A. S.; BRASIL-COSTA, I.; DOS SANTOS, E. J. M.; FALCAO, L. F. M.; VALLINOTO, A. C. R. Cytokine Profiles Associated With Acute COVID-19 and Long COVID-19 Syndrome. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 12, p. 922422, 2022.

REDONDO, N.; ZALDIVAR-LOPEZ, S.; GARRIDO, J. J.; MONTOYA, M. SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. **Front Immunol**, v. 12, p. 708264, 2021.

REYNOLDS, D.; VAZQUEZ GUILLAMET, C.; DAY, A.; BORCHERDING, N.; VAZQUEZ GUILLAMET, R.; CHORENO-PARRA, J. A.; HOUSE, S. L.; O'HALLORAN, J. A.; ZUNIGA, J.; ELLEBEDY, A. H.; BYERS, D. E.; MUDD, P. A. Comprehensive Immunologic Evaluation of Bronchoalveolar Lavage Samples from Human Patients with Moderate and Severe Seasonal Influenza and Severe COVID-19. **J Immunol**, v. 207, n. 5, p. 1229-1238, Sep 1 2021.

SACCON, T. D.; MOUSOVICH-NETO, F.; LUDWIG, R. G.; CARREGARI, V. C.; DOS ANJOS SOUZA, A. B.; DOS PASSOS, A. S. C.; MARTINI, M. C.; BARBOSA, P. P.; DE SOUZA, G. F.; MURARO, S. P.; FORATO, J.; AMORIM, M. R.; MARQUES, R. E.; VERAS, F. P.; BARRETO, E.; GONCALVES, T. T.; PAIVA, I. M.; FAZOLINI, N. P. B.; ONODERA, C. M. K.; MARTINS JUNIOR,

R. B.; DE ARAUJO, P. H. C.; BATAH, S. S.; VIANA, R. M. M.; DE MELO, D. M.; FABRO, A. T.; ARRUDA, E.; QUEIROZ CUNHA, F.; CUNHA, T. M.; PRETTI, M. A. M.; SMITH, B. J.; MARQUES-SOUZA, H.; KNITTEL, T. L.; RUIZ, G. P.; PROFETA, G. S.; FONTES-CAL, T. C. M.; BORONI, M.; VINOLO, M. A. R.; FARIAS, A. S.; MORAES-VIEIRA, P. M. M.; BIZZACCHI, J. M. A.; TEESALU, T.; CHAIM, F. D. M.; CAZZO, E.; CHAIM, E. A.; PROENCA-MODENA, J. L.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; OSAKO, M. K.; LEIRIA, L. O.; MORI, M. A. SARS-CoV-2 infects adipose tissue in a fat depot- and viral lineage-dependent manner. **Nat Commun**, v. 13, n. 1, p. 5722, Sep 29 2022.

SARIS, A.; REIJNDERS, T. D. Y.; NOSSENT, E. J.; SCHUURMAN, A. R.; VERHOEFF, J.; ASTEN, S. V.; BONTKES, H.; BLOK, S.; DUITMAN, J.; BOGAARD, H. J.; HEUNKS, L.; LUTTER, R.; VAN DER POLL, T.; GARCIA VALLEJO, J. J.; ART, D. C.; THE AMSTERDAM, U. M. C. C. S. G. Distinct cellular immune profiles in the airways and blood of critically ill patients with COVID-19. **Thorax**, v. 76, n. 10, p. 1010-1019, Oct 2021.

SCHNEIDER, W. M.; CHEVILLOTTE, M. D.; RICE, C. M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. **Annu Rev Immunol**, v. 32, p. 513-45, 2014.

SCHOGGINS, J. W. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? **Annu Rev Virol**, v. 6, n. 1, p. 567-584, Sep 29 2019.

SCHULTE-SCHREPPING, J.; REUSCH, N.; PACLIK, D.; BASSLER, K.; SCHLICKEISER, S.; ZHANG, B.; KRAMER, B.; KRAMMER, T.; BRUMHARD, S.; BONAGURO, L.; DE DOMENICO, E.; WENDISCH, D.; GRASSHOFF, M.; KAPPELLOS, T. S.; BECKSTETTE, M.; PECHT, T.; SAGLAM, A.; DIETRICH, O.; MEI, H. E.; SCHULZ, A. R.; CONRAD, C.; KUNKEL, D.; VAFADARNEJAD, E.; XU, C. J.; HORNE, A.; HERBERT, M.; DREWS, A.; THIBEAULT, C.; PFEIFFER, M.; HIPPENSTIEL, S.; HOCKE, A.; MULLER-REDETZKY, H.; HEIM, K. M.; MACHLEIDT, F.; UHRIG, A.; BOSQUILLON DE JARCY, L.; JURGENS, L.; STEGEMANN, M.; GLOSENKAMP, C. R.; VOLK, H. D.; GOFFINET, C.; LANDTHALER, M.; WYLER, E.; GEORG, P.; SCHNEIDER, M.; DANG-HEINE, C.; NEUWINGER, N.; KAPPERT, K.; TAUBER, R.; CORMAN, V.; RAABE, J.; KAISER, K. M.; VINH, M. T.; RIEKE, G.; MEISEL, C.; ULAS, T.; BECKER, M.; GEFFERS, R.; WITZENRATH, M.; DROSTEN, C.; SUTTORP, N.; VON KALLE, C.; KURTH, F.; HANDLER, K.; SCHULTZE, J. L.; ASCHENBRENNER, A. C.; LI, Y.; NATTERMANN, J.; SAWITZKI, B.; SALIBA, A. E.; SANDER, L. E.; DEUTSCHE, C.-O. I. Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. **Cell**, v. 182, n. 6, p. 1419-1440 e23, Sep 17 2020.

SETTE, A.; CROTTY, S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. **Cell**, v. 184, n. 4, p. 861-880, Feb 18 2021.

SINGH, J.; MALIK, P.; PATEL, N.; POTHURU, S.; ISRANI, A.; CHAKINALA, R. C.; HUSSAIN, M. R.; CHIDHARLA, A.; PATEL, H.; PATEL, S. K.; RABBANI, R.; PATEL, U.; CHUGH, S.; KICHLOO, A. Kidney disease and COVID-19 disease severity-systematic review and meta-analysis. **Clin Exp Med**, v. 22, n. 1, p. 125-135, Feb 2022.

SINHA, P.; MATTHAY, M. A.; CALFEE, C. S. Is a "Cytokine Storm" Relevant to COVID-19? **JAMA Intern Med**, v. 180, n. 9, p. 1152-1154, Sep 1 2020.

SIU, K. L.; KOK, K. H.; NG, M. J.; POON, V. K. M.; YUEN, K. Y.; ZHENG, B. J.; JIN, D. Y. Severe acute respiratory syndrome coronavirus M protein inhibits type I interferon production by impeding the formation of TRAF3.TANK.TBK1/IKKepsilon complex. **J Biol Chem**, v. 284, n. 24, p. 16202-16209, Jun 12 2009.

SU, H.; YANG, M.; WAN, C.; YI, L. X.; TANG, F.; ZHU, H. Y.; YI, F.; YANG, H. C.; FOGO, A. B.; NIE, X.; ZHANG, C. Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with

COVID-19 in China. **Kidney Int**, v. 98, n. 1, p. 219-227, Jul 2020.

TISONCIK, J. R.; KORTH, M. J.; SIMMONS, C. P.; FARRAR, J.; MARTIN, T. R.; KATZE, M. G. Into the eye of the cytokine storm. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 76, n. 1, p. 16-32, Mar 2012.

Johns Hopkins University & Medicine. COVID-19 dashboard. 2021. Available at: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>. Accessed March 10, 2023.

VAN DE VEERDONK, F. L.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E.; PICKKERS, P.; DERDE, L.; LEAVIS, H.; VAN CREVEL, R.; ENGEL, J. J.; WIERSINGA, W. J.; VLAAR, A. P. J.; SHANKAR-HARI, M.; VAN DER POLL, T.; BONTEN, M.; ANGUS, D. C.; VAN DER MEER, J. W. M.; NETEA, M. G. A guide to immunotherapy for COVID-19. **Nat Med**, v. 28, n. 1, p. 39-50, Jan 2022.

VAN LAARHOVEN, A.; KURVER, L.; OVERHEUL, G. J.; KOOISTRA, E. J.; ABDO, W. F.; VAN CREVEL, R.; DUIVENVOORDEN, R.; KOX, M.; TEN OEVER, J.; SCHOUTEN, J.; VAN DE VEERDONK, F. L.; VAN DER HOEVEN, H.; RAHAMAT-LANGENDOEN, J.; VAN RIJ, R. P.; PICKKERS, P.; NETEA, M. G. Interferon gamma immunotherapy in five critically ill COVID-19 patients with impaired cellular immunity: A case series. **Med**, v. 2, n. 10, p. 1163-1170 e2, Oct 8 2021.

VERAS, F. P.; PONTELLI, M. C.; SILVA, C. M.; TOLLER-KAWAHISA, J. E.; DE LIMA, M.; NASCIMENTO, D. C.; SCHNEIDER, A. H.; CAETITE, D.; TAVARES, L. A.; PAIVA, I. M.; ROSALES, R.; COLON, D.; MARTINS, R.; CASTRO, I. A.; ALMEIDA, G. M.; LOPES, M. I. F.; BENATTI, M. N.; BONJORNO, L. P.; GIANNINI, M. C.; LUPPINO-ASSAD, R.; ALMEIDA, S. L.; VILAR, F.; SANTANA, R.; BOLLELA, V. R.; AUXILIADORA-MARTINS, M.; BORGES, M.; MIRANDA, C. H.; PAZIN-FILHO, A.; DA SILVA, L. L. P.; CUNHA, L. D.; ZAMBONI, D. S.; DAL-PIZZOL, F.; LEIRIA, L. O.; SIYUAN, L.; BATAH, S.; FABRO, A.; MAUAD, T.; DOLHNIKOFF, M.; DUARTE-NETO, A.; SALDIVA, P.; CUNHA, T. M.; ALVES-FILHO, J. C.; ARRUDA, E.; LOUZADA-JUNIOR, P.; OLIVEIRA, R. D.; CUNHA, F. Q. SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. **J Exp Med**, v. 217, n. 12, Dec 7 2020.

VINCENT, J. L.; MORENO, R.; TAKALA, J.; WILLATTS, S.; DE MENDONCA, A.; BRUINING, H.; REINHART, C. K.; SUTER, P. M.; THIJIS, L. G. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. **Intensive Care Med**, v. 22, n. 7, p. 707-10, Jul 1996.

WALTER, M. R. The Role of Structure in the Biology of Interferon Signaling. **Front Immunol**, v. 11, p. 606489, 2020.

WAN, Y.; SHANG, J.; GRAHAM, R.; BARIC, R. S.; LI, F. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. **J Virol**, v. 94, n. 7, Mar 17 2020.

WANG, C.; HORBY, P. W.; HAYDEN, F. G.; GAO, G. F. A novel coronavirus outbreak of global health concern. **Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 470-473, Feb 15 2020.

WANG, K.; CHEN, W.; ZHANG, Z.; DENG, Y.; LIAN, J. Q.; DU, P.; WEI, D.; ZHANG, Y.; SUN, X. X.; GONG, L.; YANG, X.; HE, L.; ZHANG, L.; YANG, Z.; GENG, J. J.; CHEN, R.; ZHANG, H.; WANG, B.; ZHU, Y. M.; NAN, G.; JIANG, J. L.; LI, L.; WU, J.; LIN, P.; HUANG, W.; XIE, L.; ZHENG, Z. H.; ZHANG, K.; MIAO, J. L.; CUI, H. Y.; HUANG, M.; ZHANG, J.; FU, L.; YANG, X. M.; ZHAO, Z.; SUN, S.; GU, H.; WANG, Z.; WANG, C. F.; LU, Y.; LIU, Y. Y.; WANG, Q. Y.; BIAN, H.; ZHU, P.; CHEN, Z. N. CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. **Signal Transduct Target Ther**, v. 5, n. 1, p. 283, Dec 4 2020.

WANG, S.; QIU, Z.; HOU, Y.; DENG, X.; XU, W.; ZHENG, T.; WU, P.; XIE, S.; BIAN, W.; ZHANG,

C.; SUN, Z.; LIU, K.; SHAN, C.; LIN, A.; JIANG, S.; XIE, Y.; ZHOU, Q.; LU, L.; HUANG, J.; LI, X. AXL is a candidate receptor for SARS-CoV-2 that promotes infection of pulmonary and bronchial epithelial cells. **Cell Res**, v. 31, n. 2, p. 126-140, Feb 2021.

WHITTAKER, A.; ANSON, M.; HARKY, A. Neurological Manifestations of COVID-19: A systematic review and current update. **Acta Neurol Scand**, v. 142, n. 1, p. 14-22, Jul 2020.

WIERSINGA, W. J.; RHODES, A.; CHENG, A. C.; PEACOCK, S. J.; PRESCOTT, H. C. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. **JAMA**, v. 324, n. 8, p. 782-793, Aug 25 2020.

WILLIAMSON, E. J.; WALKER, A. J.; BHASKARAN, K.; BACON, S.; BATES, C.; MORTON, C. E.; CURTIS, H. J.; MEHRKAR, A.; EVANS, D.; INGLESBY, P.; COCKBURN, J.; MCDONALD, H. I.; MACKENNA, B.; TOMLINSON, L.; DOUGLAS, I. J.; RENTSCH, C. T.; MATHUR, R.; WONG, A. Y. S.; GRIEVE, R.; HARRISON, D.; FORBES, H.; SCHULTZE, A.; CROKER, R.; PARRY, J.; HESTER, F.; HARPER, S.; PERERA, R.; EVANS, S. J. W.; SMEETH, L.; GOLDACRE, B. Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 430-436, Aug 2020.

WU, D.; YANG, X. O. Dysregulation of Pulmonary Responses in Severe COVID-19. **Viruses**, v. 13, n. 6, May 21 2021.

WU, F.; ZHAO, S.; YU, B.; CHEN, Y. M.; WANG, W.; SONG, Z. G.; HU, Y.; TAO, Z. W.; TIAN, J. H.; PEI, Y. Y.; YUAN, M. L.; ZHANG, Y. L.; DAI, F. H.; LIU, Y.; WANG, Q. M.; ZHENG, J. J.; XU, L.; HOLMES, E. C.; ZHANG, Y. Z. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265-269, Mar 2020.

WU, Y.; KANG, L.; GUO, Z.; LIU, J.; LIU, M.; LIANG, W. Incubation Period of COVID-19 Caused by Unique SARS-CoV-2 Strains: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA Netw Open**, v. 5, n. 8, p. e2228008, Aug 1 2022.

XIONG, Y.; LIU, Y.; CAO, L.; WANG, D.; GUO, M.; JIANG, A.; GUO, D.; HU, W.; YANG, J.; TANG, Z.; WU, H.; LIN, Y.; ZHANG, M.; ZHANG, Q.; SHI, M.; LIU, Y.; ZHOU, Y.; LAN, K.; CHEN, Y. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. **Emerg Microbes Infect**, v. 9, n. 1, p. 761-770, Dec 2020.

YANG, X.; YU, Y.; XU, J.; SHU, H.; XIA, J.; LIU, H.; WU, Y.; ZHANG, L.; YU, Z.; FANG, M.; YU, T.; WANG, Y.; PAN, S.; ZOU, X.; YUAN, S.; SHANG, Y. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. **Lancet Respir Med**, v. 8, n. 5, p. 475-481, May 2020.

ZAID, Y.; DORE, E.; DUBUC, I.; ARCHAMBAULT, A. S.; FLAMAND, O.; LAVIOLETTE, M.; FLAMAND, N.; BOILARD, E.; FLAMAND, L. Chemokines and eicosanoids fuel the hyperinflammation within the lungs of patients with severe COVID-19. **J Allergy Clin Immunol**, v. 148, n. 2, p. 368-380 e3, Aug 2021.

ZHAO, M. M.; YANG, W. L.; YANG, F. Y.; ZHANG, L.; HUANG, W. J.; HOU, W.; FAN, C. F.; JIN, R. H.; FENG, Y. M.; WANG, Y. C.; YANG, J. K. Cathepsin L plays a key role in SARS-CoV-2 infection in humans and humanized mice and is a promising target for new drug development. **Signal Transduct Target Ther**, v. 6, n. 1, p. 134, Mar 27 2021.

ZHENG, B.; YUAN, M.; MA, Q.; WANG, S.; TAN, Y.; XU, Y.; YE, J.; GAO, Y.; SUN, X.; YANG, Z.; XU, P.; KONG, L.; WU, X.; XU, Q. Landscape of SARS-CoV-2 spike protein-interacting cells in human tissues. **Int Immunopharmacol**, v. 95, p. 107567, Jun 2021.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. The chemokine superfamily revisited. **Immunity**, v. 36, n. 5, p. 705-16, May 25 2012.

ANEXO A

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Características clínicas, de imagem pulmonar e laboratoriais de pacientes com infecção por SARS-CoV-2 admitidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

Pesquisador: Vandack Alencar Nobre Jr

Área Temática: A critério do CEP

Versão: 2

CAAE: 30437020.9.0000.5149

Instituição Proponente: PRO REITORIA DE PESQUISA

Patrocinador Principal: Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Minas Gerais

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.974.420

Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram obtidas dos documentos contendo as Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1531497.pdf, de 13/04/2020) e do Projeto Detalhado.

INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019 houve infecção de um grupo de pessoas na China causado por um novo tipo de coronavírus, COVID-19 (1). Até o dia 14 de março de 2020, 142539 casos foram confirmados, sendo 81021 na China e 61518 fora desse país (https://www.who.int/docs/defaultsource/coronaviruse/situation-reports/20200314-sitrep-54-covid-19.pdf?sfvrsn=dcd46351_6). A mortalidade até o momento é de 3,7% ocorrendo principalmente em pacientes idosos, portadores de comorbidades, tais como Diabetes Mellitus (DM) e hipertensão arterial sistêmica (HAS) (2). Aproximadamente em 5% dos casos, a infecção respiratória se torna grave, com necessidade de internação em terapia intensiva e necessidade de algum tipo de suporte ventilatório, tanto ventilação mecânica não-invasiva (VMNI) como ventilação mecânica invasiva (VMI) (2). A falta de tratamento específico e de vacinas para sua prevenção, implica que o diagnóstico precoce seja fundamental para o suporte adequado aos pacientes. A RT-PCR tem sido

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-040
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-6877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.974.420

o método diagnóstico de escolha para confirmação da infecção. A tomografia de tórax tem sido o método de escolha para definição de gravidade da infecção e tratamento. Padrões tomográficos tais como opacidades em vidro-fosco, consolidações irregulares multifocais e/ou padrão intersticial bilateral periférico têm sido descritos nesta epidemia (3). A ultrassonografia pulmonar à beira-leito é eficaz na determinação de padrões bem estabelecidos na insuficiência respiratória aguda (4). Associada à avaliação cardíaca e de grandes vasos demonstrou benefício na identificação dos diferentes tipos de choque (5). Na epidemia de coronavírus, estudos têm demonstrado a utilidade do uso da ultrassonografia no grupo de pacientes com infecção pulmonar. O padrão ultrassonográfico descrito em séries de casos consiste na detecção de linhas B focais, difusas ou confluentes, espessamento pleural com irregularidades, consolidações subpleurais, lobares com broncograma aéreo (6) O padrão de resposta inflamatória presente nos pacientes com infecção pelo SARS-CoV2, perfil de citocinas, quimiocinas e mesmo de marcadores rotineiramente utilizados, como a proteína C reativa (PCR) ainda não está bem determinado (7). Novos biomarcadores vem sendo associados a perfis de pacientes críticos, como suPAR, pró-ADM, pro-ET1, trail e IP-10 (8), cell free DNA(9). Trabalhos recentes demonstraram que há uma forte indução de citocinas pró-inflamatórias durante a fase aguda da infecção havendo elevação sanguíneos de IL-1b, IL1ra, IL-4, IL-8, IL-9, IL-6, IL-7, IFNg, IP-10, MCP-1, TNF, MIP-1b, VEGF, G-CSF e GM-CSF (10, 11). Além disso, pacientes que apresentaram as formas mais graves da doença apresentaram maior elevação de IL-2, IL-7, IL-10, TNF, IP-10, MCP-1, IL-8 e G-CSF quando comparados com formas mais leves da doença (10, 11) sugerindo uma forte associação entre o processo inflamatório e a evolução clínica. Além disso, a evolução do covid-19 está associado a importante linfopenia com diminuição dos linfócitos T CD4, CD8 e Tregs, afetando de forma mais importante os pacientes graves. Associado a tal depleção, há o aumento relativo de linfócitos T virgens na circulação (11). Nenhum estudo, entretanto, abordou a evolução da resposta inflamatória e como se dá a resolução da mesma. Além disso, o pulmão é o principal órgão acometido pela covid-19, mas não há estudos avaliando a dinâmica inflamatório de aspirado bronco-alveolar. Poucos estudos avaliaram o processo de coagulação em pacientes com SARS-CoV-2. Entretanto, estudos preliminares indicam que sua função está significativamente alterada em comparação com pessoas saudáveis. Além disso, estes estudos relatam uma associação entre altos níveis de dímero D, produtos de degradação da fibrina e tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativado alargados (12, 13). Nos últimos anos cresceu, de forma significativa, o número de pesquisas que investigam cfDNA como biomarcador em pacientes críticos, incluindo pacientes com sepse (14, 15). Muitos estudos em pacientes críticos

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

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.974.420

demonstraram o cfDNA com preditor de mortalidade, entre eles pacientes com sepse e síndrome do desconforto respiratório agudo (9, 16, 17) como melhor preditor de mortalidade do que os escores MODS (Multiple Organ Dysfunction) e APACHE II (18). Este biomarcador também apresentou boa correlação com a gravidade da infecção em pacientes críticos, sendo a eficiência diagnóstica dos níveis de cfDNA similar à dos níveis de procalcitonina e da proteína C-reativa (19). Do ponto de vista terapêutico, ainda não há um agente farmacológico específico para o tratamento da COVID-19, sendo utilizadas rotineiramente medidas gerais de suporte clínico. Algumas drogas de ação antiviral e imunomoduladoras estão em investigação. Apesar dos achados ainda preliminares, baseados em dados observacionais, um estudo muito recente identificou uma redução substancial da carga viral do SARS-CoV-2 em trato respiratório de pacientes que fizeram uso de hidroxiquina, em comparação a controles negativos(20). Dependendo da gravidade de apresentação dos casos e da avaliação do perfil de segurança da droga, pretende-se que protocolos assistenciais locais possam vir a incorporar tal estratégia terapêutica no decorrer dos próximos dias ou semanas. Diante do exposto, o objetivo deste estudo é avaliar as características clínicas, laboratoriais e de imagem (incluindo dados de ultrassonografia, radiografia e tomografia de tórax), investigando a associação entre essas variáveis, em pacientes adultos internados com suspeita ou confirmação de COVID 19 no Hospital das Clínicas da UFMG durante a duração da epidemia.

HIPÓTESES

As características dos pacientes com infecção por coronavírus diferem nos pacientes com outras infecções conhecidas. No grupo de pacientes normalmente atendidos no HC-UFMG, devido às suas doenças de base como doenças hematológicas, transplantados (fígado, rins, medula óssea), a COVID 19 terá comportamento diferente.

A resposta inflamatória poderá ter associação com a gravidade, como desfechos relacionados à mortalidade, tempo de internação, tempo de ventilação mecânica entre outros.

METODOLOGIA

Delineamento e local do estudo: Trata-se de uma coorte prospectiva, único centro, realizado no HC-UFMG, localizado na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. O HC-UFMG é uma unidade de hospitalar integrado ao SUS com 504 leitos, sendo 30 leitos de terapia intensiva. Coleta de material biológico: será coletado amostra de sangue (volume total de 25 ml), dividida da seguinte forma: tubo seco para soro (10 ml), tubo com adição de citrato (5 ml) e tubo com

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

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.974.420

heparina (10 ml), à admissão e nos dias 3 e 7 de seguimento. O material será separado em alíquotas e armazenado em freezer a -80o do Laboratório Multiusuário da Faculdade de Medicina da UFMG (freezer Grupo NIIMI) para posterior análise. Em pacientes intubados, coletaremos também aspirado bronco-alveolar em sistema fechado no dia da intubação e nos dias 3 e 7 de seguimento, ou no dia da extubação. Os exames laboratoriais: tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa), tempo de trombina (TT), fibrinogênio e dímeros D serão realizados no aparelho ACL Top 550 (Werfen, Artamon, Australia). O teste de geração de trombina será realizado por método inhouse validado (4) no equipamento Fluoroskan Ascent FL (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finlândia). Protocolo ultrassonográfico: Será utilizado ultrassom portátil Terason 3000® disponível na unidade. Os transdutores setorial e linear segundo a indicação. Exames seriados serão realizados em todos os pacientes admitidos com suspeita ou confirmação de infecção por coronavírus. Exames diários serão realizados, de acordo com o segundo protocolo: Seis janelas em cada hemitórax serão avaliadas a saber: divisão de cada hemitórax em regiões anterior, lateral e posterior, de acordo com as linhas axilar anterior e posterior. Cada região será posteriormente dividida em superior e inferior de acordo com linha imaginária à altura do mamilo (Fig 1). Serão avaliados os seguintes parâmetros: Presença de deslizamento pleural; Padrão pulmonar de linhas A ou B; Se linhas B definir se linhas B definir suas características: bem delimitadas ou coalescentes; presença de espessamento pleural; presença de consolidações subpleurais, focais ou múltiplas. Avaliação de Biomarcadores séricos e pulmonares: A quantificação de citocinas, quimiocinas e pró- ADM, suPAR, pro-ET1, trail e IP-10 será realizada no soro das amostras de pacientes com suspeita ou confirmação de infecção por coronavírus. O soro será obtido a partir de centrifugação (centrifugação por 15 minutos a 2000g e 3850 rpm a 4 graus), alíquotado em tubos de Eppendorf e estocado a -80° C para posterior análise. Serão utilizados kits comerciais disponíveis para análise. Os níveis séricos e no aspirado pulmonar de IFN-, TNF-, IL-6, IL-1, IL-10, IL-17, CCL3, CXCL10, CCL2, CCL8, CXCL9, CCL5, pentraxin-3 (PTX3) e NETs serão mensurados através do teste de Enzyme-linked immunosorbent assays (E.L.I.S.A., R&D System para dosagem em espectrofotômetro) usando anticorpos da RD System. Placas de 96 poços serão cobertas com 50L/poço do anticorpo específico e os resultados serão expressos em picogramas/ mL. Será analisada também a fonte de citocinas e a caracterização das células do sistema imune por citometria de fluxo no sangue periférico e no aspirado bronco-alveolar. Serão avaliados os perfis de linfócitos T auxiliares (CD3+CD4+), citotóxicos (CD3+CD8+), reguladores (CD3+CD4+CD25+CD127lowFoxP3+) ILC (Lin-CD45+CD127+), NK (Lin-CD56+CD16+). Investigaremos também células mieloides como as Células Dendríticas

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

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.974.420

(CD11c+) e monócitos (CD14+CD16+/-). Marcadores de ativação e regulação (HLA-DR, CD80, CD107, GITR, PD1, LAG3, LAP) e citocinas (IFNg, IL17A, IL10, TNF e IL4/IL13) serão avaliados para se estabelecer o perfil de resposta imune associado a evolução patológica.

CRITÉRIO DE INCLUSÃO

Adultos com 18 anos ou mais E suspeita ou confirmação de infecção por coronavírus.

CRITÉRIO DE EXCLUSÃO

Recusa em participar do estudo através da recusa de assinatura do TCLE.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO

O objetivo deste estudo é avaliar as características clínicas, laboratoriais e de imagem (incluindo dados de ultrassonografia, radiografia e tomografia de tórax), investigando a associação entre essas variáveis, em pacientes adultos internados com suspeita ou confirmação de COVID 19 no Hospital das Clínicas da UFMG durante a duração da epidemia.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Descrever em pacientes admitidos em enfermaria e CTI as seguintes variáveis:

- Casuística: idade, sexo, presença de comorbidades (diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica (12), doença pulmonar obstrutiva crônica [DPOC], neoplasias sólidas, neoplasias hematológicas, doenças auto-imunes e inflamatórias), escores de gravidade clínica à admissão tais como SAPS-3 (21), SOFA (22) e APACHE-II (23).
- Características radiográficas encontradas.
- Características ultrassonográficas: utilização de protocolo pulmonar previamente utilizado em estudos realizados na instituição (24) Figuras 1 e 2.
- Comparar os achados ultrassonográficas com as radiográficas.
- Comparar os achados ultrassonográficas com os níveis de marcadores inflamatórios séricos.
- Comparar os achados ultrassonográficas com as características clínicas dos pacientes e com o prognóstico.
- Determinar fluxo de atendimento institucional de pacientes com suspeita ou confirmação de COVID19 por meio de dados clínicos e ultrassonográficos (Figura 2).
- Determina e descrever os seguintes dados laboratoriais encontrados: cinética da proteína C reativa, global de leucócitos (segmentados e linfócitos), ureia e creatinina, enzimas hepáticas

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

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.974.420

(ASAT-ALAT-bilirrubinas), coagulograma.

- Avaliar perfil de citocinas inflamatórias e quimiocinas e correlaciona-los com os grupos ajustados pela gravidade.
- Avaliar o perfil de novos biomarcadores: suPAR, pró-ADM, pro-ET1, trail e IP-10, cell free DNA.
- Comparar a cinética dos biomarcadores entre pacientes com suspeita e confirmação de infecção por coronavírus.
- Estudar os desfechos secundários: tempo de VMI, tempo de internação em CTI e hospitalar, mortalidade em CTI e hospitalar.
- Analisa biomarcadores séricos para correlação posterior com desfechos relacionados à necessidade de VMI, tempo de internação em CTI e mortalidade.
- Desenvolver classificadores utilizando análise dos dados com técnicas de teorias de redes, teoria da informação, data mining e inteligência artificial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

Os riscos associados a este projeto estarão relacionados à punção venosa para coleta de material biológico (sangue), como hematoma no sítio de punção. Poderá ser também coletado através de punção arterial previamente puncionada para monitorização hemodinâmica. O ultrassom à beira-leito não está associada a riscos adicionais, já que é método não invasivo, sem emissão de radiação. A coleta de aspirado traqueal será realizada sem desconexão do paciente. É método habitualmente realizado em ambientes de terapia intensiva. Os pacientes serão acompanhados durante toda a sua internação em UTI e seu sigilo de identidade será guardado. Futuramente, os dados coletados se tornarão públicos.

BENEFÍCIOS

Este estudo trará conhecimento sobre a infecção por SARS-CoV-2 em vários aspectos, a saber:

- Dados clínicos e epidemiológicos da população afetada.
- Conhecimento sobre a resposta inflamatória através da dosagem de diferentes biomarcadores que auxiliarão em futuros estudos de tratamento.
- Conhecer a evolução da doença com relação ao comprometimento pulmonar através de diferentes métodos de imagem: radiografia, ultrassonografia e tomografia.
- Conhecer as características da nossa população comprometida.
- Desenvolver planos de ação para tratamento.

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

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.974.420

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo de coorte prospectiva, único centro, realizado no HC-UFMG.

O estudo visa avaliar as características clínicas, laboratoriais e de imagem (incluindo dados de ultrassonografia, radiografia e tomografia de tórax), investigando a associação entre essas variáveis, em pacientes internados com suspeita ou confirmação de COVID 19.

Procedimentos realizados no estudo:

- Para o projeto de pesquisa será coletado amostra de sangue para exames laboratoriais e avaliação de biomarcadores séricos e pulmonares (incluindo biomarcadores genéticos).
- Pacientes intubados, será coletado também aspirado bronco-alveolar em sistema fechado no dia da intubação e nos dias 3 e 7 de seguimento, ou no dia da extubação.
- Realização de protocolo ultrassonográfico.
- Diagnóstico específico da infecção viral - coleta de swab e de nasofaringe (parte do processo assistencial dos pacientes incluídos no estudo).x'

Previsão do número de participantes de pesquisa a serem incluídos no estudo: 200.

Previsão de início do estudo: 01/04/2020.

Previsão de encerramento do estudo: 31/08/2021.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Análise das respostas ao Parecer Consubstanciado nº 3.965.370 emitido em 11/04/2020:

1. Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (para participantes e responsável legal), intitulado "TCLE_COVID_HC_UFMG.pdf":

1.1. Lê-se no TCLE: "Iremos fazer vários exames para entender as alterações do seu corpo diante da infecção e vamos fazer exames de ultrassom e analisar os dados clínicos da sua papeleta". Foi informado no TCLE quais amostras biológicas serão coletadas, entretanto não há informação sobre quais exames serão realizadas com tais amostras. É necessário descrever no TCLE todos os procedimentos envolvidos na pesquisa, incluindo quais análises serão realizadas e suas respectivas finalidades, em linguagem clara e acessível à compreensão leiga. Diante do exposto:

1.1.1. Solicita-se descrever no TCLE os procedimentos a serem realizados na pesquisa, pontuando

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

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.974.420

quais análises serão realizadas nas amostras biológicas e o objetivo de cada análise (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.3.a).

RESPOSTA: Os procedimentos a serem realizados foram listados nas novas versões do TCLE para o participante e responsável legal), conforme constam nos documentos revisados, enviados via Plataforma Brasil.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.1.2. Solicita-se descrever no TCLE quais FAMÍLIAS de genes/segmentos de DNA e/ou RNA serão analisadas nas amostras biológicas coletadas para o estudo. O pesquisador poderá descrever os genes estudados de forma agrupada segundo a funcionalidade ou o efeito (exemplo: genes relacionados ao aparecimento do câncer, inflamação, morte celular, resposta ao tratamento etc.) não sendo necessário listá-los individualmente, respeitando-se a capacidade de compreensão do participante de pesquisa (Carta Circular nº 041/2015/CONEP/CNS/MS, itens 2.a e 2.b).

RESPOSTA: Os fragmentos de genes que serão estudados (cell free DNA) foram citados nos TCLEs documentos revisados, de forma mais genérica, com ênfase na representatividade e efeito a ser investigado desses compostos.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.2. Solicita-se inserir no TCLE a explicitação acerca do direito de buscar indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.3.h).

RESPOSTA: Foram inseridas nas versões atualizadas dos TCLEs a explicitação acerca do direito de buscar indenizações em caso de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Solicitam-se esclarecimentos quanto ao destino das amostras biológicas ao final das análises (exames) realizadas no estudo, isto é, se as amostras serão ou não destruídas. Caso as amostras sejam armazenadas para análises futuras, solicita-se adequar os TCLEs inseridos na Plataforma Brasil à Resolução CNS nº 441 de 2011 e à Portaria MS nº 2.201 de 2011.

RESPOSTA: Foram acrescentadas nos TCLEs informações sobre a criação de um repositório de amostras biológicas e seu objetivo, dando ao participante ou a seu responsável legal dando a opção de escolher entre a necessidade ou não de a equipe de pesquisa apresentar novo TCLE quando da eventual utilização das amostras estocadas.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

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

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.974.420

Considerações Finais a critério da CONEP:

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

Situação: Protocolo aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|------------------------|--------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1531497.pdf | 13/04/2020 13:43:54 | | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_modificado_sem_marcas_responsavel.docx | 13/04/2020 13:38:38 | Vandack Alencar Nobre Jr | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_modificado_sem_marcas_participante.docx | 13/04/2020 13:38:20 | Vandack Alencar Nobre Jr | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_modificado_marcadas_responsavel.docx | 13/04/2020 13:38:04 | Vandack Alencar Nobre Jr | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_modificado_marcadas_participante.docx | 13/04/2020 13:37:45 | Vandack Alencar Nobre Jr | Aceito |
| Outros | Carta_reposta_parecer_versao_1.pdf | 13/04/2020 13:37:31 | Vandack Alencar Nobre Jr | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_pesquisa_emergencial_COVID_300320.pdf | 31/03/2020 17:44:07 | Vandack Alencar Nobre Jr | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_COVID_HC_UFMG.pdf | 31/03/2020 17:34:21 | Vandack Alencar Nobre Jr | Aceito |
| Folha de Rosto | Folha_de_rosto_COVID.pdf | 31/03/2020 17:21:41 | Vandack Alencar Nobre Jr | Aceito |

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

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.974.420

Situação do Parecer:
Aprovado

BRASILIA, 16 de Abril de 2020

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

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

APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO/Participante

Você está sendo convidado pelos pesquisadores Dr. Vandack Alencar Nobre Jr e Dra. Cecília Gomez Ravetti para participar de uma pesquisa sobre o coronavírus. A pesquisa se chama “Características epidemiológicas, clínicas, imagenológicas e laboratoriais de pacientes com infecção por COVID-19 admitidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais”.

A participação nesse estudo é voluntária e você tem o direito de recusar sem qualquer prejuízo ao seu tratamento nesta instituição. Após ler este termo ou ele ter sido explicado para você, sinta-se à vontade para perguntar e tirar todas as dúvidas que você tiver.

Como todos têm acompanhado, em dezembro de 2019 houve infecção de um grupo de pessoas na China causado por um novo tipo de coronavírus, o SARS-CoV-2 (o causador da COVID-19). Em aproximadamente 5% dos casos, a infecção respiratória se torna grave, com necessidade de internação em terapia intensiva e necessidade de algum tipo de suporte ventilatório, e a mortalidade até o momento foi de 3,7%, acometendo principalmente pacientes idosos com outras doenças. Para melhorar o atendimento, precisamos entender como esse vírus adoece a população brasileira. Para isso, pretendemos investigar como os pacientes com coronavírus estão adoecendo, quais são as implicações na sua saúde e nos seus exames e como o sistema imunológico está combatendo a infecção.

Se você aceitar participar, iremos coletar amostras de sangue e, caso você precise de ajuda de um aparelho para respirar, vamos coletar amostras aspiradas do seu pulmão. Também iremos fazer vários exames para entender as alterações do seu corpo diante da infecção e vamos fazer exames de ultrassom e analisar os dados clínicos da sua papeleta.

A participação em qualquer projeto de pesquisa possui riscos, mas garantimos que nosso interesse principal é o restabelecimento completo da sua saúde. Os exames e coletas adicionais propostos nesse projeto são de baixo risco e não irão interferir na capacidade do seu corpo em combater o vírus. Por exemplo, o ultrassom é uma ferramenta que não traz

Rúbrica participante _____

Rúbrica do Pesquisador _____

nenhum prejuízo para o paciente, já que não é invasivo e não emite radiação, à diferença de outros métodos de imagem. O exame será realizado em menos de 15 minutos, sem necessidade de transporte. Da mesma forma, a pesquisa realizará procedimentos simples de coleta de sangue na veia do braço do Sr./ da Sra. por 5 dias (5 ml de sangue por dia), juntamente com a coleta de sangue da manhã e de 15 ml nos dias 0 (hoje), 3 e 7. A coleta de sangue pode causar hematoma no local, mas vamos utilizar a mesma punção que será utilizada para exames de rotina. Caso você precise de CTI, além das coletas de sangue, vamos também coletar aspirado do seu pulmão para avaliar como o sistema imunológico está combatendo o vírus direto no pulmão. O aspirado pulmonar é um procedimento de rotina em pacientes com suporte ventilatório em CTI e não será realizado apenas para o propósito dessa pesquisa, apenas vamos guardar o aspirado feito rotineiramente e estudá-lo.

Você tem o direito de retirar a autorização (ou consentimento) para essa pesquisa a qualquer momento sem sofrer qualquer alteração no seu atendimento ou tratamento neste hospital; basta comunicar a equipe da pesquisa. Você não irá se beneficiar diretamente ao participar desse estudo, mas contribuirá para que a COVID-19 seja melhor entendida, ajudando a equipe da pesquisa a desenvolver novos exames e estratégias para lidar com essa doença. O (A) Sr. (Sra.) não terá qualquer tipo de despesa para participar da pesquisa e não receberá remuneração por sua participação. No caso de algum dano, nossa equipe assumirá toda responsabilidade e ressarcimentos cabíveis. Caso receba alta, a coleta não será mais necessária para a pesquisa e sua participação estará encerrada.

Gostaríamos ainda de informar que os pesquisadores assumem o dever de dar assistência aos participantes da pesquisa para problemas relacionados aos procedimentos citados acima ou mesmo para quaisquer outros problemas da saúde apresentados durante a pesquisa. Os registros (informações dos pacientes) serão mantidos de forma confidencial com códigos de identificação de acesso limitado, e o nome do paciente não será mencionado em nenhum momento.

Rúbrica participante _____

Rúbrica do Pesquisador _____

Consentimento:

Eu _____ entendi o que me foi proposto e tive oportunidade de esclarecer minhas dúvidas. Concordo em participar da pesquisa sobre COVID-19. Estou ciente dos riscos e dos benefícios da minha participação. Estou ciente de que os resultados serão publicados somente em conjunto, não permitindo a minha identificação individual. Estou ciente de que posso retirar minha participação a qualquer momento sem prejuízo do meu atendimento.

Nome/assinatura do participante da pesquisa

Belo Horizonte, __/__/__

Testemunha imparcial no caso de analfabeto

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Rúbrica participante _____

Rúbrica do Pesquisador _____

APÊNDICE 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO/Responsável

Você está sendo convidado a autorizar a participação de um ente querido numa pesquisa sobre coronavírus pelos pesquisadores Dr. Vandack Alencar Nobre Jr e Dra. Cecília Gomez Ravetti. A pesquisa se chama “Características epidemiológicas, clínicas, imagenológicas e laboratoriais de pacientes com infecção por COVID-19 admitidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.”

A participação do seu ente querido nesse estudo é voluntária e você tem o direito de recusar sem qualquer prejuízo ao tratamento dele (a) nesta instituição. Após ler este termo, ou ele ter sido explicado para você, sinta-se à vontade para perguntar e tirar todas as dúvidas que você tiver.

Como todos têm acompanhado, em dezembro de 2019 houve infecção de um grupo de pessoas na China causado por um novo tipo de coronavírus, o SARS-CoV-2 (o causador da COVID-19). Em aproximadamente 5% dos casos, a infecção respiratória se torna grave, com necessidade de internação em terapia intensiva e necessidade de algum tipo de suporte ventilatório, e a mortalidade até o momento foi de 3,7%, acometendo principalmente pacientes idosos com outras doenças. Para melhorar o atendimento, precisamos entender como esse vírus adoece a população brasileira. Para isso, pretendemos investigar como os pacientes com coronavírus estão adoecendo, quais são as implicações na sua saúde e nos seus exames e como o sistema imunológico está combatendo a infecção.

Se você aceitar que estudemos a doença em seu ente querido, iremos coletar amostras de sangue e, caso ele(a) precise de ajuda de um aparelho para respirar, vamos coletar amostras aspiradas do pulmão também. Iremos fazer vários exames para entender as alterações do seu corpo diante da infecção e vamos fazer exames de ultrassom e analisar os dados clínicos da sua papeleta.

A participação em qualquer projeto de pesquisa possui riscos, mas garantimos que nosso interesse principal é o restabelecimento da saúde do seu ente querido. Os exames e

Rúbrica responsável _____

Rúbrica do Pesquisador _____

coletas adicionais propostos nesse projeto são de baixo risco e não irão interferir na capacidade do seu corpo em combater o vírus. Por exemplo, o ultrassom é uma ferramenta que não traz nenhum prejuízo para o paciente, já que não é invasivo e não emite radiação, à diferença de outros métodos de imagem. O exame será realizado em menos de 15 minutos sem necessidade de transporte. Da mesma forma, a pesquisa realizará procedimentos simples de coleta de sangue na veia do braço por 5 dias (5 ml, ou uma colherinha de chá, de sangue por dia), juntamente com a coleta de sangue da manhã, e de 15 ml (ou três colheres de chá) nos dias 0 (hoje), 3 e 7. A coleta de sangue pode causar hematoma no local, mas vamos utilizar a mesma punção que será utilizada para exames de rotina. Caso ele(a) precise de CTI, além das coletas de sangue, vamos também coletar aspirado do pulmão para avaliar como o sistema imunológico está combatendo o vírus direto no pulmão. O aspirado pulmonar é um procedimento de rotina em pacientes com suporte ventilatório em CTI e não será realizado apenas para o propósito dessa pesquisa, apenas vamos guardar o aspirado feito rotineiramente e estudá-lo.

Você tem o direito de retirar essa autorização (ou consentimento) a qualquer momento sem que seu ente querido sofra qualquer alteração no atendimento ou tratamento neste hospital; basta comunicar a equipe da pesquisa. É importante informar que seu ente querido não irá se beneficiar diretamente ao participar desse estudo, mas contribuirá para que a COVID-19 seja melhor entendida, ajudando a equipe da pesquisa a desenvolver novos exames e estratégias para lidar com essa doença. O (A) Sr (Sra.), nem seu ente querido, terão qualquer tipo de despesa para participar da pesquisa e não receberão remuneração pela participação. No caso de algum dano, nossa equipe assumirá toda responsabilidade e ressarcimentos cabíveis. Caso receba alta, a coleta não será mais necessária para a pesquisa e a participação dele(a) estará encerrada.

Garantimos que os registros (informações dos pacientes) serão mantidos de forma confidencial com códigos de identificação de acesso limitado, e o nome do paciente não será mencionado em nenhum momento.

Rúbrica responsável _____

Rúbrica do Pesquisador _____

Este Termo deverá ser assinado em duas vias, sendo uma para você, como representante legal do participante, e outra para os pesquisadores.

Se você tiver alguma dúvida sobre a pesquisa, pode entrar em contato direto com os pesquisadores responsáveis:

1 - Dr. Vandack Alencar Nobre Jr: (31) 3309-4195 / 99831-0004 - email:
vandack@gmail.com

2 - Dra Cecília Gomez Ravetti (31) 99959-6555 - email: ceciliag.ravetti@gmail.com

Av. Alfredo Balena, 190 – Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG – Santa Efigênia – Belo Horizonte, MG – Brasil – CEP 30130-100

Se você tiver dúvidas éticas, pode consultar o **Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG**:
Telefax (31) 3409- 4592. Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º andar, sl. 2005 – Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil – CEP 31270-901.

Rúbrica responsável _____

Rúbrica do Pesquisador _____

Consentimento:

Eu _____ entendi o que me foi proposto e tive oportunidade de esclarecer minhas dúvidas. Concordo em participar da pesquisa sobre COVID-19. Estou ciente dos riscos e dos benefícios da minha participação. Estou ciente de que os resultados serão publicados somente em conjunto, não permitindo a minha identificação individual. Estou ciente que posso retirar minha participação a qualquer momento sem prejuízo do meu ente querido.

Nome/assinatura do participante da pesquisa

Belo Horizonte, __/ __/ __

Testemunha imparcial no caso de analfabeto

Nome do pesquisador que aplicou o

Rúbrica responsável _____

Rúbrica do Pesquisador _____