

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

GUSTAVO PALMER IRFFI

CARACTERIZAÇÕES DOS ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E DO  
INFLAMASSOMA NLRP3 NA COVID-19

Belo Horizonte

2022

GUSTAVO PALMER IRFFI

CARACTERIZAÇÕES DOS ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E DO  
INFLAMASSOMA NLRP3 NA COVID-19

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Área de concentração: Patologia Investigativa.

Orientador: Prof. Marcelo Antonio Pascoal Xavier.

Belo Horizonte

2022

043 Gustavo Palmer Irffi.  
Caracterizações dos aspectos histopatológicos e do inflamassoma NLRP3 na Covid-19 [manuscrito] / Gustavo Palmer Irffi. – 2022.  
107 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Marcelo Antonio Pascoal Xavier.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Covid-19. 3. Betacoronavirus. 4. Inflamassomos. 5. Proteína 3 que Contém Domínio de Pirina da Família NLR. 6. Autopsia. I. Xavier, Marcelo Antonio Pascoal. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 616

# DECLARAÇÃO DE DEFESA

14/09/2022 16:43

SEI/UFMG - 1621617 - Folha de Aprovação



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**“CARACTERIZAÇÕES DOS ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E DO INFLAMASSOMA NLRP3 NA COVID-19”**

**GUSTAVO PALMER IRFFI**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de **Pós-Graduação em Patologia**, como requisito para obtenção do grau de **Mestre em PATOLOGIA**, área de concentração **PATOLOGIA INVESTIGATIVA**.

Aprovada em 14 de julho de 2022, pela banca constituída pelos membros:

**Profª. Milene Alvarenga Rachid - ICB/UFMG**

**Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira - Fiocruz/Salvador/Bahia**

**Prof. Marcelo Antônio Pascoal Xavier - Faculdade de Medicina/UFMG – ORIENTADOR**

**Belo Horizonte, 13 de julho de 2022.**



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Antonio Pascoal Xavier, Professor do Magistério Superior**, em 01/08/2022, às 15:58, 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 **Milene Alvarenga Rachid, Servidor(a)**, em 03/08/2022, às 13:05, 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 **Geraldo Gileno de Sá Oliveira, Usuário Externo**, em 05/09/2022, às 14:51, 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](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1621617** e o código CRC **415BDE85**.

Referência: Processo nº 23072.243616/2022-49

SEI nº 1621617

*À Taynara, por dividir as madrugadas com a luz acesa e o barulho do teclado; a introspecção da escrita e as conversas epifânicas, com amor.*

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho não seria possível sem a participação direta ou indireta de diversas pessoas, entidades e tecnologias. Dessa forma, aqui ficam os agradecimentos a todos vocês!

Aos meus pais, Márcia e Elígius, e meus irmãos, Caroline (*in memoriam*) e Rodrigo, obrigado pelo amor, carinho e suporte durante toda a minha caminhada antes e durante a pós-graduação!

À Taynara, minha esposa, por estar presente em todos os caminhos, sempre com amor, cumplicidade e paciência.

À Roselene, Nonato, Nayara e Bill, minha segunda família, por todo apoio, amor e boas energias.

Ao professor Marcelo, por ter dividido seu tempo e conhecimento, pelo convite de participar e construir este trabalho e por responder a todas minhas perguntas e anseios com a calma e a serenidade de sempre.

A todos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG e a todos da Residência Médica em Patologia da UFMG.

À equipe do Instituto René Rachou (Fiocruz Minas) e do Hospital Eduardo de Menezes - FHEMIG, em especial ao colega Magno, pela participação no trabalho e nos resultados.

Aos meus amigos, que aguentaram todas as reclamações e encontros desmarcados.

A toda equipe do Laboratório Analys, pelos ensinamentos, suporte e acolhimento.

E a todos que não estão listados aqui diretamente, mas que participaram, de uma forma ou de outra, da construção desta obra.

Muito obrigado!

*Eu gosto do absurdo divino das imagens.*

Manoel de Barros

## RESUMO

A COVID-19 é resultado da infecção humana pelo SARS-CoV-2, que infecta as células-alvo e ativa diversos mecanismos inflamatórios, como a via do inflamassoma NLRP3, que tem como produtos a IL-1 $\beta$ , a IL-18 e a Caspase-1, contribuindo para uma resposta inflamatória sistêmica. O estudo das alterações morfológicas decorrentes da COVID-19 fatal, por meio da autópsia minimamente invasiva, representa importante oportunidade para o melhor conhecimento dessa nova doença. Com o objetivo de caracterizar os aspectos histopatológicos e avaliar o inflamassoma NLRP3 na COVID-19 fatal, esse estudo observacional, transversal e unicêntrico analisou 50 casos de autópsia minimamente invasiva que evoluíram para óbito no Hospital Eduardo de Menezes - MG, durante o ano de 2020. As amostras apresentaram elevada representatividade histológica. As principais lesões histopatológicas observadas foram dano alveolar difuso (64,45%) no pulmão e focos de infiltrado inflamatório no coração (32,61%), fígado (70%) e rim (21,4%). Também foram observados elevados percentuais de lesões isquêmicas cardíacas, esteatose hepática, congestão esplênica e necrose tubular aguda. A expressão imuno-histoquímica do NLRP3 apresentou elevada reatividade no pulmão, coração e rins, com associações estatisticamente significativas de IL-18 (valor-p = 0,004) no pulmão e de IL-1 $\beta$  (valor-p = 0,002) e IL-18 (valor-p = 0,005) no rim. Os resultados do estudo permitem concluir que a autópsia minimamente invasiva possibilita adequado exame anatomopatológico para verificação do óbito e que a COVID-19 fatal apresenta importante componente inflamatório sistêmico, com participação do inflamassoma NLRP3.

**PALAVRAS-CHAVE:** COVID-19; SARS-CoV-2; Inflamassoma; NLRP3; Autópsia Minimamente Invasiva; Aspectos Histopatológicos.

## ABSTRACT

The COVID-19 is the result of the infection by the SARS-CoV-2, that infects the target cells and activates many inflammatory mechanisms, such as NLRP3 inflammasome, that releases IL-1 $\beta$ , IL-18 and Caspase-1, contributing to a systemic inflammatory response. The study of morphological aspects resulting from fatal COVID-19, through minimally invasive autopsy, represents an important opportunity for a better understanding of this new disease. With the aim of characterizing the histopathological aspects and evaluating the NLRP3 inflammasome in fatal COVID-19, this observational, cross-sectional and unicentric study analyzed 50 cases samples, collected by minimally invasive autopsy, of patients who died of COVID-19 in the Eduardo de Menezes - MG Hospital, during the year of 2020. The samples showed high histological representativeness. The main histopathological lesion observed were diffuse alveolar damage (64,45%) in the lungs and foci of inflammatory infiltrate in the heart (32,61%), liver (70%) and kidney (21,4%). In addition, were observed high percentages of ischemic heart lesions, hepatic steatosis, splenic congestion, and acute tubular injury. The immunohistochemical expression of NLRP3 showed high reactivity in the lungs, heart and kidneys, with statistically significant associations of IL-18 (p-value = 0,004) in the lung and of IL-1 $\beta$  (p-value = 0,002) in the kidney. The results of this study let us to conclude that the minimally invasive autopsy makes available adequate anatomopathological examination of death verification, and that fatal COVID-19 has an important systemic inflammatory component, with participation of the NLRP3 inflammasome.

**KEYWORDS:** COVID-19; SARS-CoV-2, Inflammasome, NLRP3, Minimally Invasive Autopsy; Histological Findings.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema ilustrativo da estrutura do SARS-CoV-2.....	18
Figura 2 – Relação dos números de casos confirmados da COVID-19 e óbitos pela doença, mundialmente .....	20
Figura 3 – Relação dos números de casos confirmados da COVID-19 e óbitos pela doença, no Brasil.....	21
Figura 4 – Esquema da ativação do inflamassoma NLRP3.....	32
Figura 5 – Aspectos histopatológicos pulmonares: DAD .....	62
Figura 6 – Aspectos histopatológicos pulmonares: hiperplasia de pneumócitos tipo 2, fibrose intersticial e infiltrado intersticial associado a hemorragia .....	63
Figura 7 – Aspectos histopatológicos pulmonares: hemorragia intra-alveolar e necrose do parênquima .....	64
Figura 8 – Aspectos histopatológicos pulmonares: área de metaplasia escamosa e presença de células gigantes multinucleadas.....	66
Figura 9 – Aspectos histopatológicos pulmonares: pneumonia .....	67
Figura 10 – Aspectos histopatológicos cardíacos: infiltrado inflamatório .....	69
Figura 11 – Aspectos histopatológicos cardíacos: fibrose.....	70
Figura 12 – Aspectos histopatológicos hepáticos: esteatose .....	72
Figura 13 – Aspectos histopatológicos hepáticos: infiltrado inflamatório e “fígado do choque” .....	73
Figura 14 – Aspectos histopatológicos esplênicos: atrofia da polpa branca, hemorragia intraparenquimatosa e hematofagocitose.....	75
Figura 15 – Aspectos histopatológico renais: NTA e nefrite túbulo-intersticial.....	77
Figura 16 – Aspectos histopatológico renais: microangiopatia trombótica, glomeruloesclerose e glomerulopatia colapsante .....	79
Figura 17 – Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$ e IL-18 nas amostras de pulmão.....	82
Figura 18 – Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$ e IL-18 nas amostras de coração .....	84
Figura 19 – Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$ e IL-18 nas amostras de fígado.....	86

Figura 20 – Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$ e IL-18 nas amostras de baço .....	88
Figura 21 – Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$ e IL-18 nas amostras de rim .....	90
Figura 22 – Gráficos de setores das principais lesões histopatológicas observadas nas autópsias minimamente invasivas .....	91
Gráfico 1 – Coração: quantidade de amostras representativas .....	51
Gráfico 2 – Fígado: quantidade de amostras representativas .....	52
Gráfico 3 – Fígado: distribuição de frequência de quantidade dos tratos portais nos fragmentos .....	53
Gráfico 4 – Baço: quantidade de amostras representativas .....	54
Gráfico 5 – Rim direito: distribuição da frequência da contagem de glomérulos.....	55
Gráfico 6 – Rim esquerdo: distribuição da frequência da contagem de glomérulos.....	56
Gráfico 7 – Número médio de fragmentos por órgão.....	57
Gráfico 8 – Comprimento total médio dos fragmentos por órgão.....	58
Gráfico 9 – Gráfico de barras da expressão imuno-histoquímica de NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$ e IL-18 nas amostras de pulmão.....	81
Gráfico 10 – Gráfico de barras da expressão imuno-histoquímica de NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$ e IL-18 nas amostras de coração.....	83
Gráfico 11 – Gráfico de barras da expressão imuno-histoquímica de NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$ e IL-18 nas amostras de fígado.....	85
Gráfico 12 – Gráfico de barras da expressão imuno-histoquímica de NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$ e IL-18 nas amostras de baço .....	87
Gráfico 13 – Gráfico de barras da expressão imuno-histoquímica de NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$ e IL-18 nas amostras de rim .....	89
Quadro 1 – Critérios de intensidade e percentual de análise das amostras de imuno-histoquímica .....	46
Quadro 2 – Critérios de escore final da análise das amostras de imuno-histoquímica .....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características das biópsias teciduais no procedimento minimamente invasivo dos órgãos alvo do projeto .....	42
Tabela 2 – Critérios de representatividade de acordo com a topografia/órgão .....	44
Tabela 3 – Anticorpos utilizados para marcação imuno-histoquímica do inflamassoma .....	45
Tabela 4 – Características demográficas dos participantes – proporção de idade entre os participantes.....	48
Tabela 5 – Proporção entre os sexos dos participantes .....	48
Tabela 6 – Proporção das comorbidades dos participantes .....	49
Tabela 7 – Pulmão direito e esquerdo: quantidade de amostras representativas.....	50
Tabela 8 – Rins direito e esquerdo: quantidade de amostras representativas ou não.....	54
Tabela 9 – Tipo, graduação e frequência das lesões pulmonares .....	59
Tabela 10 – Tipo, graduação e frequência das lesões cardíacas.....	68
Tabela 11 – Tipo, graduação e frequência das lesões hepáticas.....	71
Tabela 12 – Tipo, graduação e frequência das lesões esplênicas .....	74
Tabela 13 – Tipo, graduação e frequência das lesões renais .....	76
Tabela 14 – Escores da expressão imuno-histoquímica do inflamassoma NLRP3 no pulmão, coração, fígado e rim .....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2019 n-CoV	2019 <i>novel coronavirus</i>
AC	Autópsia convencional
ACE-2	<i>Angiotensin-converting enzyme 2</i> (Enzima conversora de angiotensina 2)
ALT	<i>Alanine transaminase</i>
ANOVA	Análise de variância
AST	<i>Aspartate transaminase</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BOOP	<i>Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia</i>
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CD	<i>Cluster differentiation</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEST	<i>Central European Summer Time</i>
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
CNS	Conselho Nacional de Saúde
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>
CTI	Centro de terapia intensiva
D	Direito
DAD	Dano alveolar difuso
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
E	Esquerdo
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FHEMIG	Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HE	Hematoxilina e Eosina
HEM	Hospital Eduardo de Menezes
HIV/AIDS	<i>Human Immunodeficiency Virus / Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
IFN	Interferon
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal

IP-10	<i>Interferon gamma-induced protein 10</i>
IRF	Fator regulador do interferon
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MERS-CoV	<i>Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus</i>
MIA	<i>Minimally invasive autopsy</i>
MIA	<i>Minimally invasive autopsy</i>
MIS	<i>Multisystem inflammatory syndrome</i>
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NLRP3	<i>NOD-like receptor, pyrin domain-containing protein 3</i>
NOS	<i>Non otherwise specified</i>
NTA	Necrose tubular aguda
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados aos patógenos
PAS	<i>Periodic Acid Schiff</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PGN	Patrimônio genético
pH	Potencial hidrogeniônico
PPRs	Receptores de reconhecimento de padrões
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RM	Ressonância magnética
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
ROS	<i>Reactive oxygen species products</i>
SARS-CoV	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i>
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
SRAG	Síndrome respiratória aguda grave
TC	Tomografia computadorizada
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMA	Microangiopatia trombótica
TMPRSS2	<i>Transmembrane protease serine 2</i>
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>17</b>
2.1 SARS-CoV-2 E COVID-19 .....	17
2.1.1 ASPECTOS CONCEITUAIS.....	17
2.1.2 EPIDEMIOLOGIA.....	19
2.1.3 CLÍNICA, SINTOMAS E EVOLUÇÃO .....	22
2.1.4 RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO.....	26
2.1.5 TEMPESTADE DE CITOCINAS E SÍNDROME DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA .....	28
2.1.6 INFLAMASSOMA NLRP3 .....	30
2.2 ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DA COVID-19 E AUTÓPSIA MINIMAMENTE INVASIVA .....	33
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
3.1 GERAL .....	39
3.2 ESPECÍFICOS .....	39
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>40</b>
4.1 APRECIÇÃO ÉTICA.....	40
4.2 TIPO DE PESQUISA .....	40
4.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	41
4.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	41
4.4.1 PROCEDIMENTO DA AUTÓPSIA MINIMAMENTE INVASIVA.....	41
4.4.2 EXAME HISTOPATOLÓGICO E CRITÉRIOS DE ANÁLISE.....	43
4.4.3 EXAME IMUNO-HISTOQUÍMICO .....	45
4.5 ANÁLISE DOS DADOS .....	47
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
5.1 VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO DA AUTÓPSIA MINIMAMENTE INVASIVA (MIA) .....	50
5.1.1 REPRESENTATIVIDADE HISTOLÓGICA .....	50
5.1.2 NÚMERO DE FRAGMENTOS.....	56
5.1.3 MEDIDA DOS FRAGMENTOS.....	58
5.2 DESCRIÇÃO DAS VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS.....	59
5.3 EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO INFLAMASSOMA NLRP3.....	81
5.4 ASSOCIAÇÕES ESTATÍSTICAS .....	91
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>94</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>100</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>101</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A pandemia da COVID-19 (*Coronavirus disease*), declarada pela Organização Mundial da Saúde em março de 2020 (CUCINOTTA; VANELLI, 2020), como resultado de infecção humana pelo *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) (ZHOU *et al.*, 2020; GUAN *et al.*, 2020), ainda desafia a vigilância epidemiológica e impõe ameaças à organização dos sistemas de saúde. Com fácil transmissão entre humanos por via oral, nasal ou contato direto pela mucosa oral, o vírus infecta o hospedeiro fazendo a ligação de sua glicoproteína estrutural tipo *spike* (proteína S) à enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) e ao TMPRSS2 (CARAMASCHI *et al.*, 2021). Nos casos mais graves, a resposta inflamatória do hospedeiro apresenta liberação elevada de citocinas pró-inflamatórias, formando a chamada “tempestade de citocinas” (ZHAO *et al.*, 2021). Este estado pró-inflamatório sistêmico favorece o quadro de dano alveolar difuso, indicativo da fase inicial da síndrome respiratória aguda grave (SRAG), que é caracterizada por edema pulmonar, formação de membrana hialina e presença de resposta inflamatória (FU *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2020; MATTHAY *et al.*, 2019). Além do trato respiratório, que é usualmente o primeiro sítio a ser lesado pela infecção viral, outros órgãos também são afetados, como coração, fígado, baço e rins (CARAMASCHI *et al.*, 2021).

Essas alterações inflamatórias locais e sistêmicas provocadas pela SARS-CoV-2 estão associadas à ativação do inflamassoma (ZHAO *et al.*, 2021). Os inflamassomas são complexos de proteínas formados no citosol em resposta a diferentes estímulos intra e extra-celulares, sendo o inflamassoma NLRP3 um dos mais estudados (NAKAJIMA *et al.*, 2013; NAKAJIMA *et al.*, 2012; DING *et al.*, 2003; ZHAO *et al.*, 2021). Essa via tem como finalidade a liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18, além da Caspase-1, tendo como consequência a instauração da apoptose mediada pela inflamação (piroptose) das células infectadas e de processos inflamatórios sistêmicos (NAKAJIMA *et al.*, 2013; NAKAJIMA *et al.*, 2012; DING *et al.*, 2003; TAY *et al.*, 2020). Além disso, outros biomarcadores inflamatórios liberados são a interleucina (IL)-6, IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-17 e TNF $\alpha$ , que aumentam progressivamente durante a doença, particularmente nos participantes admitidos em terapia intensiva (CHEN *et al.*, 2020). Com essa reação exacerbada, imunomoduladores presentes na corrente sanguínea atingem vários órgãos, ocasionando quadro de hiperinflamação sistêmica que leva às alterações hemodinâmicas, como o choque, e ao óbito (NAKAJIMA *et al.*, 2013; NAKAJIMA *et al.*, 2012; DING *et al.*, 2003;).

Por isso, é fundamental o estudo das alterações morfológicas nos principais órgãos e tecidos daqueles participantes que foram infectados pelo vírus e evoluíram rapidamente para o óbito, correlacionando os aspectos clínicos com exames laboratoriais e de imagem (DE CAMPOS; ROCHA, 2015). Segundo Caramaschi e colaboradores (2020), os achados histopatológicos mais frequentes foram em topografia pulmonar, principalmente quando a presença do vírus leva ao dano alveolar difuso e suas complicações. Os demais órgãos também sofrem injúria pela infecção viral, além de haver agressão pelos efeitos do choque e da tempestade inflamatória de citocinas que ocorre durante a infecção grave da doença (CARAMASCHI *et al.*, 2020). Dessa maneira, a correlação entre os achados morfológicos e a hiperativação do inflamassoma NLRP3 pode fornecer dados que suportam a teoria de que a tempestade de citocinas é uma das responsáveis pelos danos teciduais e, muitas vezes, pela evolução para a síndrome inflamatória sistêmica e o óbito.

As correlações anatomoclínicas, classicamente, são realizadas por meio da autópsia e estudo anatomopatológico dos diversos órgãos e tecidos, que têm inestimável valor pedagógico (DE CAMPOS; ROCHA, 2015; DUARTE-NETO *et al.*, 2019). Entretanto, considerando a contraindicação da autópsia tradicional durante os primeiros anos da pandemia, com recomendações expressas das instituições, entidades e autoridades em saúde, baseadas na epidemia anterior de SARS, a realização de autópsias clássicas – abertas e completas – está restrita aos serviços que contam com laboratórios do Nível de Biossegurança 3 (LI, *et al.*, 2005). Alternativamente, considerando-se a importância da análise das lesões teciduais para diagnóstico e produção de conhecimento científico, há a indicação e uso correntes na investigação de surtos e epidemias, inclusive no Brasil (WAGENSVELD, *et al.*, 2019), da realização da autópsia minimamente invasiva por meio de biópsias percutâneas e análises histopatológica, imuno-histoquímica e molecular das amostras de tecido obtidas (DUARTE-NETO *et al.*, 2019).

Dessa forma, este trabalho tem como objetivo descrever as alterações histopatológicas e avaliar a participação do inflamassoma NLRP3 em casos de COVID-19 grave com desfecho fatal que foram admitidos e submetidos à autópsia minimamente invasiva em serviço de referência do estado de Minas Gerais.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 SARS-COV-2 E COVID-19

#### 2.1.1 ASPECTOS CONCEITUAIS

A pandemia da *Coronavirus disease* (COVID-19), declarada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em março de 2020 (CUCINOTTA, VANELLI, 2020), é o resultado da infecção humana pelo vírus *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) (GUAN, *et al.* 2020). Esse vírus, com alta capacidade patogênica e que foi responsável por infectar milhões de seres humanos nos últimos anos, desafia a vigilância epidemiológica e impõe ameaças à organização dos sistemas de saúde.

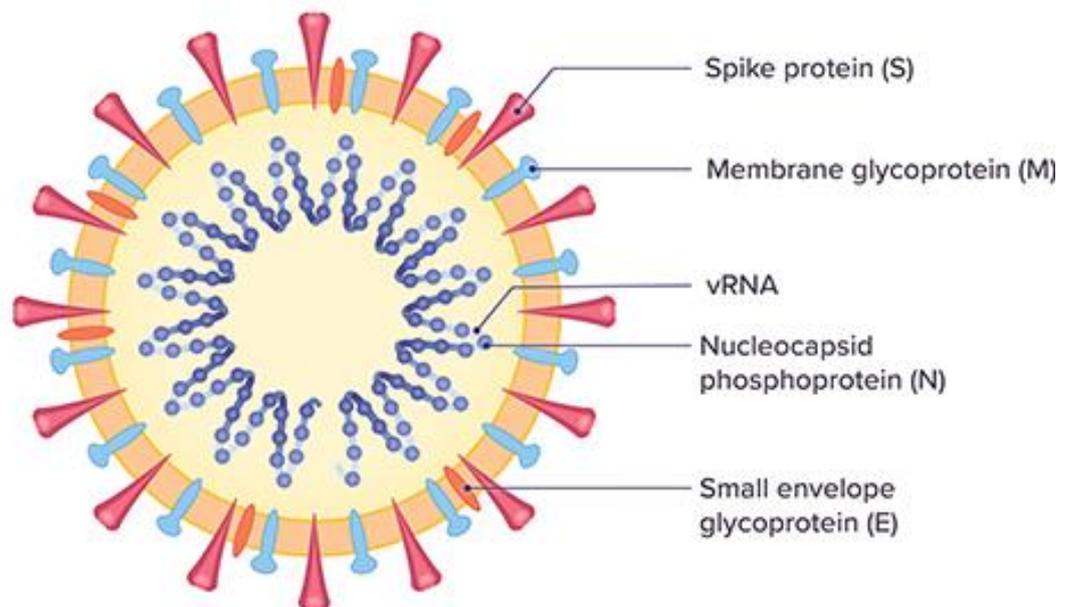
O SARS-CoV-2 é um Beta-coronavírus da família *Coronaviridae* (CALDAS, *et al.* 2020; HU, *et al.* 2021). Ele possui esse nome porque apresenta, ao exame de microscopia eletrônica de varredura, estruturas de superfície que se assemelham à figura de uma coroa (CALDAS, *et al.* 2020). Assim como seus semelhantes – *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus* (SARS-CoV) em 2002, e *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS-CoV) em 2012, que também causaram pandemias no passado, inclusive com apresentações de casos fatais por pneumonia –, o SARS-CoV-2 foi capaz de rapidamente infectar números elevados de humanos em diversas regiões do globo, superando os números prévios das outras pandemias de coronavírus, sendo um agente de alerta para o sistema de saúde do século XXI (HU, *et al.* 2021).

O coronavírus é um vírus de RNA, envelopado, que mede 60 a 140 nm de diâmetro, e tem o material genético envolvido por um capsídeo formado por uma proteína do nucleocapsídeo (N) e três outras proteínas estruturais: membrana (M), envelope (E) e glicoproteína *spike* (S), como mostrado na figura abaixo (CALDAS, *et al.* 2020; WIERSINGA, *et al.* 2020; CHAMS, *et al.* 2020). Esta última é responsável por se ligar a um receptor específico, localizado na membrana do hospedeiro, o receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (*angiotensin converting enzyme 2* – ACE2) (CALDAS, *et al.* 2020). Presente em diversas células de microrganismos

complexos, essa ligação permite a entrada do vírus nas células dos hospedeiros animais mamíferos, sendo que, dentre os principais, estão os humanos, morcegos, pangolins, camelos, dentre outros, além de algumas espécies de pássaros (CALDAS, *et al.* 2020; HU, *et al.* 2021; ZHOU *et al.* 2020).

**Figura 1 – Esquema ilustrativo da estrutura do SARS-CoV-2**

## SARS-CoV-2 Structure



**Fonte:** Retirado de CHOMS, *et al.* 2020.

Os principais dados epidemiológicos sugerem que a via de transmissão do vírus é a exposição de gotículas em contato face a face entre pessoas, durante a fala, tosse ou espirros (WIERSINGA, *et al.* 2020). A exposição prolongada em ambientes fechados, com participantes sintomáticos, também apresenta alto risco de transmissão (WIERSINGA, *et al.* 2020). A forma de transmissão nosocomial também é bem documentada, sendo uma via de transmissão alternativa à da comunidade (SHARMA, *et al.* 2021). Ainda, a via de transmissão materna, embora potencial, não se mostrou de grande relevância (SHARMA, *et al.* 2021). Após o primeiro contato, o vírus infecta as células do trato respiratório superior (epitélio nasal) e, em seguida, o trato respiratório inferior (células brônquicas e pneumócitos dos pulmões) e/ou os outros sistemas (ZHOU *et al.* 2020; WIERSINGA, *et al.* 2020). A capacidade imunológica do organismo reconhece que o patógeno pode ser diminuído pela própria ação do vírus, que tem a capacidade de eliminar os linfócitos T, causando linfopenia (WIERSINGA, *et al.* 2020). Dessa

forma, virtualmente, qualquer pessoa, em todas as idades, pode ser susceptível a infecção pelo SARS-CoV-2 (HU, *et al.* 2021). Os principais sintomas e evolução da doença serão discutidos com mais detalhes nas seções abaixo.

### 2.1.2 EPIDEMIOLOGIA

Os primeiros casos registrados da COVID-19 foram reportados na província de Wuhan, na China, no final de dezembro de 2019. Eram participantes com sintomas respiratórios e pneumonia de diversas intensidades, muitas delas graves, e com o equivalente epidemiológico de terem estado em um mesmo local, o Mercado vivo de Huanan. Com 27 episódios registrados, a Comissão Municipal de Saúde da cidade de Wuhan notificou a Organização Mundial de Saúde sobre estes casos (HU, *et al.* 2021). Após sequenciamento do RNA do vírus dos lavados broncoalveolares dos participantes, a equipe de pesquisadores anunciou que a infecção dos participantes foi causada por um beta-coronavírus em comum (HU, *et al.* 2021). Com a alta movimentação de pessoas na China, principalmente pela época festiva do ano novo chinês, os números de infectados por esse novo patógeno cresceu rapidamente, com milhares de casos positivos em janeiro de 2020. Assim, no dia 30 de janeiro a OMS declarou que o surto do novo coronavírus era um problema de saúde internacional (HU, *et al.* 2021). Em fevereiro, o antes chamado “novo coronavírus 2019-nCoV” foi nomeado para SARS-CoV-2 e a doença causada por ele nomeada para COVID-19 (HU, *et al.* 2021; Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2020). Com o aumento expressivo no número de casos nesse momento, tanto na China como em diversas outras regiões do mundo, a exemplo da Europa e da América, a OMS declarou, em março de 2020, a COVID-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2, uma pandemia (CUCINOTTA, VANELLI, 2020).

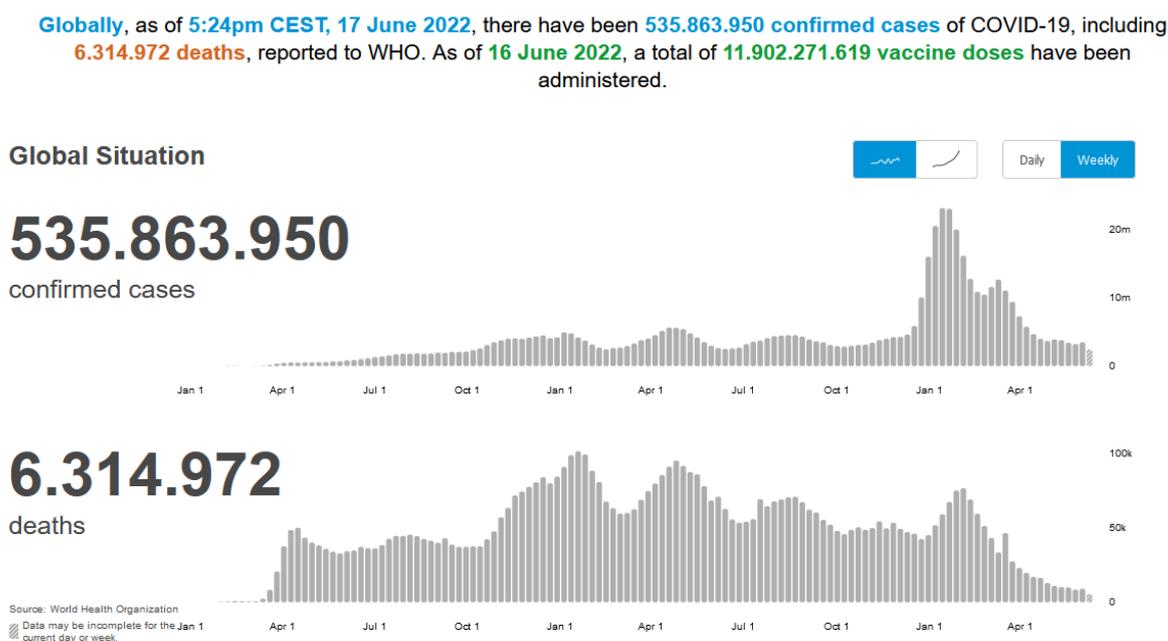
Ao longo dos anos que se seguiram, mais pessoas foram infectadas, em mais de 216 países (SHARMA, *et al.* 2021). Em geral, os sintomas são brandos, como coriza e tosse, mas casos graves também são possíveis, sendo que muitos dos infectados foram a óbito (HU, *et al.* 2021; SHARMA, *et al.* 2021). A taxa de transmissão calculada do vírus é em torno de 3-4 pessoas, com uma taxa de fatalidade de 1,4% (SHARMA, *et al.* 2021). Como comparativo com as outras pandemias por coronaviruses, o SARS-CoV, de 2002, tinha uma taxa de transmissão de 3 pessoas e 10% de taxa de mortalidade; e o MERS-CoV, menos de uma pessoa como taxa de

transmissão e chegou a 37% de taxa de mortalidade (SHARMA, *et al.* 2021). Embora esses números sejam maiores do que o da atual pandemia, elas foram restritas em uma região global, acometendo apenas 26 a 27 países e com um número centenas de vezes menor do que a COVID-19 (SHARMA, *et al.* 2021).

Vários grupos de pesquisadores mostram que os principais reservatórios do SARS-CoV-2 são mamíferos, principalmente os morcegos de regiões montanhosas e cavernosas da China (SHARMA, *et al.* 2021). Embora também sejam descritos casos de beta-coronavírus em pangolins da Malásia e China, esses têm transmissão bem mais rara do que os vírus dos morcegos (SHARMA, *et al.* 2021; XIAO, *et al.* 2020). Após a transmissão entre reservatórios animais e humanos, inicia-se a transmissão entre humanos, como comentado anteriormente, por gotículas durante a fala, tosse ou espirros, em locais fechados com pessoas sintomáticas ou por infecção nosocomial, principalmente (SHARMA, *et al.* 2021).

A figura abaixo representa os números de casos confirmados ao longo dos anos da pandemia, desde o primeiro caso até a data de 17 de junho de 2022, em todo o mundo. Uma parcela importante da população já foi diagnosticada com a doença, tendo atingido mais de 500.000.000 (quinhentas milhões) de pessoas, com mais de 6.000.000 (seis milhões) de óbitos.

**Figura 2 – Relação dos números de casos confirmados da COVID-19 e óbitos pela doença, mundialmente**

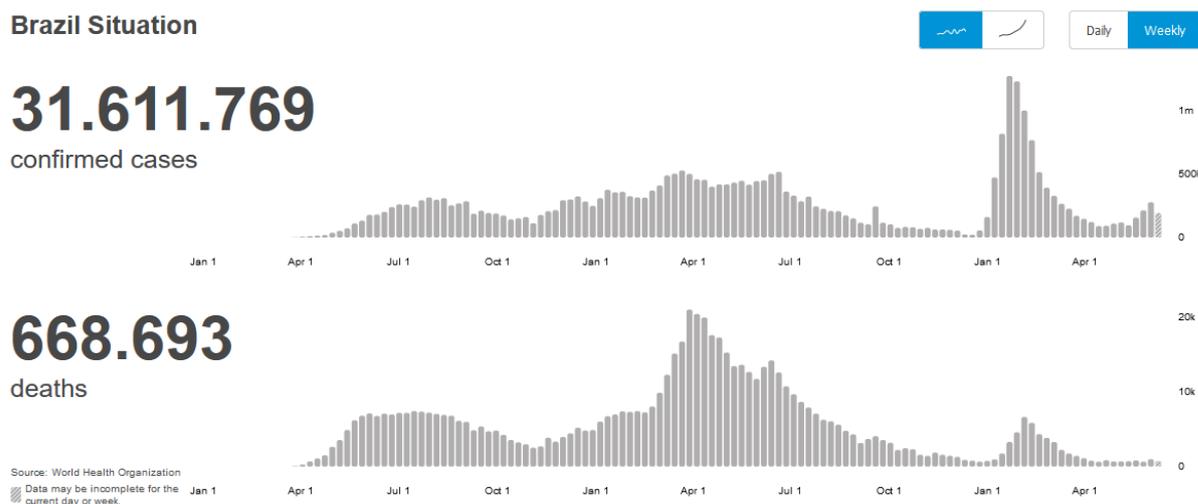


**Fonte:** Base de dados da OMS. Disponível no endereço eletrônico: <https://covid19.who.int/> (acessado em 22 de junho de 2022, às 17:24)

Esse gráfico evidencia que os casos, desde os primeiros diagnósticos, estiveram em ascensão por muito tempo, apresentando algumas épocas de regressão. Em geral, após normas restritivas mais severas, como o isolamento social e o uso de máscaras em todos os ambientes, tem-se a redução do número de casos. Também, bem como o surgimento de mutações que levam às novas variantes, geralmente elevam-se a taxa de transmissão do vírus, o que aumenta os números de casos diagnosticados, embora, nesse mesmo movimento, a taxa de letalidade tende a decair (IKBEL, 2021; ZHOU, *et al.* 2021). Vale ressaltar que a taxa de letalidade da doença manteve-se elevada durante todo o período, iniciando uma tendência de queda mais importante nos últimos semestres, apenas (IKBEL, 2021; ZHOU, *et al.* 2021).

A figura abaixo revela os dados relativos também ao número de casos confirmados e de óbitos pela COVID-19, mas agora no território brasileiro:

**Figura 3 – Relação dos números de casos confirmados da COVID-19 e óbitos pela doença, no Brasil**



**Fonte:** Base de dados da OMS. Disponível no endereço eletrônico:

<https://covid19.who.int/region/amro/country/br> (acessado em 22 de junho de 2022, às 17:28)

No caso do Brasil, até o momento da escrita deste trabalho, foram mais de 30.000.000 (trinta milhões) de casos confirmados e quase 670.000 (seiscentos e setenta mil) óbitos pela doença. Esses dados são expressivos, tendo em vista a população brasileira. O crescimento do número de casos e de queda seguiu a tendência mundial, da mesma forma, com queda expressiva dos casos após a implementação de restrições de contatos, isolamento social e uso de máscara; e aumento quando essas normas são afrouxadas ou com o surgimento de novas variantes mais

contaminantes. Uma tendência de aumento na taxa de mortalidade chama atenção no primeiro semestre de 2022, mas houve rápida desaceleração, tanto dos óbitos quanto dos novos casos confirmados.

Por fim, como uma das técnicas utilizadas para a redução do número de novos casos e, principalmente, da taxa de mortalidade da doença, as vacinas foram desenvolvidas como forma de apresentar uma resposta imune ao organismo, sem a necessidade de se infectar pelo coronavírus (IKBEL, 2021; ZHOU, *et al.* 2021). As vacinas, com diversas técnicas imunológicas, foram implementadas no ano de 2021 no Brasil e foram capazes de diminuir tanto o número de casos quanto a agressividade da infecção, reduzindo, dessa forma, a mortalidade. Com isso, foi possível aliviar certas formas de restrição social, embora a contaminação e novos casos registrados ainda estejam presentes em todo o mundo (IKBEL, 2021; ZHOU, *et al.* 2021; SHARMA, *et al.* 2021).

### **2.1.3 CLÍNICA, SINTOMAS E EVOLUÇÃO**

O SARS-CoV-2 tem a capacidade de infectar pessoas de qualquer grupo de idades. Tanto os participantes sintomáticos quanto aqueles na fase pré-sintomática ou assintomáticos são capazes de transmitir o vírus para um outro organismo (MEHTA, *et al.* 2021). O período de incubação da COVID-19 pode variar de 2 até 14 dias, com a média de 3 dias (MEHTA, *et al.* 2021; KAKODKAR, *et al.* 2020). Na maioria dos casos de COVID-19, a doença tende a apresentar-se com sintomas brandos a moderados, com o maior risco de complicações ou casos graves em participantes acima dos 65 anos de idade e/ou com comorbidades, como diabetes melitus, hipertensão arterial sistêmica, doenças coronarianas e outras doenças crônicas (MEHTA, *et al.* 2021; JIN, *et al.* 2020). Além disso, estudos mostram que a doença tende a ser mais grave em homens do que em mulheres (TAY, *et al.* 2020).

O principal órgão a ser afetado por esse coronavírus é o pulmão, mas qualquer outro órgão pode ser alvo dessa infecção, de forma direta ou por agressão pela resposta imune desregulada (MEHTA, *et al.* 2021). Após a exposição do organismo por gotículas contaminadas, o vírus infecta, inicialmente, as células do epitélio da mucosa respiratória do nariz e faringe, seguido

pela migração do vírus para o parênquima pulmonar (MEHTA, *et al.* 2021; ZHOU *et al.* 2020; WIERSINGA, *et al.* 2020). O vírus utiliza da sua proteína *spike* de membrana para se ligar ao receptor da ACE2 da célula do hospedeiro, possibilitando a infecção, por isso, as células do trato respiratório, as células endoteliais, da mucosa intestinal e do parênquima renal (ricas nesse tipo de receptor) são os principais alvos a serem infectados (MEHTA, *et al.* 2021; ZHOU *et al.* 2020; WIERSINGA, *et al.* 2020). Com isso, esses órgãos que são mais afetados justificam os principais sinais e sintomas apresentados pelos participantes. Além disso, a depender do grau de agressão e da resposta imune do hospedeiro (vide tópico abaixo), as apresentações mais brandas ou mais severas afetam o paciente.

Os principais sinais e sintomas de um paciente com suspeita de COVID-19 são: febre, tosse (geralmente seca), fadiga, produção de secreção, dispneia (dificuldade respiratória), dor de garganta, calafrios, congestão nasal e hemoptise (MEHTA, *et al.* 2021). Alguns participantes evoluem para a forma grave, com dano agudo pulmonar, síndrome da angústia respiratória e choque séptico (MEHTA, *et al.* 2021). Em geral, o tempo de evolução entre o início dos sintomas, surgimento da dispneia, internação hospitalar e a complicação para a síndrome da angústia respiratória aguda é, em média, de 7 dias (KAKODKAR, *et al.* 2020).

Os sintomas do trato respiratório se iniciam logo nos primeiros dias, geralmente como irritação da mucosa nasal, tosse seca ou dispneia. Quando a dispneia é intensa e diminui a saturação em ar ambiente do paciente para menos de 93%, pode haver necessidade de internação e suporte ventilatório (invasivo ou não invasivo), sendo que, em geral, a oxigenação por pressão positiva mostra bons resultados clínicos em grande parte dos participantes (MEHTA, *et al.* 2021). O achado radiológico típico da infecção do SARS-CoV-2 no parênquima pulmonar é o aspecto em vidro fosco e opacidade bilateral, evidenciado ao exame de tomografia computadorizada do tórax (GUAN, *et al.* 2020). Esse achado de imagem tem concordância com o dano que o vírus causa nas células do parênquima pulmonar, com o achado de dano alveolar difuso ao exame microscópico (ver adiante). A possibilidade de exacerbação do quadro por infecções secundárias, como pneumonias bacterianas, pode complicar ainda mais a situação de saúde do paciente. Enquanto os sintomas pulmonares são os que podem levar o paciente facilmente a internação, complicações e óbito, os sintomas no nariz, garganta e ouvidos são os mais frequentes em consultas médicas por queixas de COVID-19 (MEHTAR, *et al.* 2021). Nestes, são descritos irritação da garganta, rinorreia, congestão nasal, edema das tonsilas palatinas e alargamento dos linfonodos cervicais; de forma peculiar, em alguns grupos de participantes há

anosmia (perda de olfato) e/ou disgeusia (perda de paladar) (GUAN, *et al.* 2020; MEHTAR, *et al.* 2021).

O sistema cardiovascular pode ser afetado de forma direta pela agressão do vírus, pela resposta inflamatória da infecção, pela tempestade de citocinas (ver adiante), danos metabólicos, rupturas de placas e alterações isquêmicas por eventos tromboembólicos, efeitos de tratamentos por drogas ou alterações secundárias por hipóxia, insuficiência respiratória ou hipovolemia (BANSAL, 2020; MEHTAR, *et al.* 2021).

O sistema gastrointestinal apresenta como principais sintomas anorexia, diarreia, vômitos e dores abdominais. Como é possível identificar a presença do material genético do vírus nas fezes de participantes, infere-se que o vírus consegue infectar as células da mucosa gastrointestinal, também pelos receptores ACE2 expressados por elas (PAN, *et al.* 2020; MEHTAR, *et al.* 2021). A elevação de enzimas aminotransferases (AST e ALT) indicam que pode haver lesão hepática associada a COVID-19, possivelmente por dano hepatotóxico às drogas, injúria hepática por hipóxia ou falência múltipla de órgãos e à inflamação sistêmica (PAN, *et al.* 2020; MEHTAR, *et al.* 2021).

O parênquima renal é rico em receptores da ACE2, por esse motivo, há elevado risco de o vírus infectar as células renais com facilidade, como os podócitos e as células do epitélio tubular (MEHTAR, *et al.* 2021; CHAMS, *et al.* 2020). Também, de forma indireta, danos secundários endoteliais podem levar a lesão dos podócitos e, conseqüente, injúria renal aguda (MEHTAR, *et al.* 2021). De formas semelhantes aos outros órgãos, danos indiretos da lesão renal podem ser hipóxia, tempestade de citocinas, rabdomiólise, efeito nefrotóxico das drogas e infecções secundárias. Com isso, os principais sintomas de lesões renais são: proteinúria, hematúria, uremia, elevação da creatinina e piora da filtração glomerular (CHENG, *et al.* 2020). Por fim, os participantes pós-transplantados renais estão em uma situação mais complicada, uma vez que estão imunossuprimidos, podem apresentar pouca sintomatologia, como febres mais baixas, com piores quadros clínicos, em geral com piora da função renal e maiores necessidades de necessidade de ventilação mecânica com altos índices de mortalidade (MEHTAR, *et al.* 2021).

O SARS-CoV-2 têm a capacidade de infectar as células ganglionares do bulbo olfatório e, dessa forma, ou pela via hematogênica, infectar o sistema nervoso central dos participantes. Após isso, a lesão de células neuronais e células da glia podem ser observados, o que justificaria os

principais sintomas do sistema nervoso central. Destes, os mais descritos são: cefaléia, confusão, delírio, anosmia ou hiposmia, disgeusia ou ageusia, status mental alterado, ataxia e convulsões. Associado aos eventos tromboembólicos, acidentes vasculares cerebrais podem ser encontrados; e associado à hipóxia generalizada, encefalopatia hipóxico-isquêmica pode ser observada. Outras apresentações do sistema nervoso, podem incluir: encefalopatia viral, meningites, Síndrome de Guillain-Barré, Síndrome de Miller Fisher, dentre outros (MEHTAR, *et al.* 2021).

Nos outros sistemas, podemos observar sinais de conjuntivite, espectro variado de alterações cutâneas, sendo o exantema e *rash* maculopapular. No sistema muscular, observam-se fadiga e/ou quadros de rabdomiólise com elevações de creatinina-kinase, principalmente nos casos mais graves e com falência múltipla dos órgãos (MEHTAR, *et al.* 2021). Em relação ao sistema hematológico, a doença desencadeia inflamação sistêmica e, ocasionalmente, a tempestade de citocinas (discutidas abaixo). Há redução na contagem de leucócitos, com linfopenia, leucopenia e trombocitopenia. Quando há leucocitose, em geral, pode haver alguma infecção secundária associada. Quando em casos graves, coagulação intravascular disseminada (CIVD) pode acontecer (MEHTAR, *et al.* 2021). Huang e colaboradores (2020), mostram que há elevação de interleucina (IL)-6, IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , dentre outras citocinas, o que condiz com a inflamação sistêmica dos participantes e risco de desenvolver a tempestade de citocinas.

A associação entre os piores desfechos e participantes com diabetes melitus é bem descrita por diversos autores em toda a literatura médica nos últimos anos. Outras doenças endócrinas ou grupos especiais, como crianças, gestantes e participantes imunocomprometidos são enquadrados como participantes com maiores riscos de complicações da doença (MEHTAR, *et al.* 2021). Por fim, qualquer paciente pode evoluir com envolvimento multissistêmico, com piora do quadro clínico, danos a órgãos alvo e, inclusive, o óbito (MEHTAR, *et al.* 2021; CHAMS, *et al.* 2020).

### 2.1.4 RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO

Inicialmente, quando o vírus infecta o organismo, há tropismo para as células do epitélio respiratório superior e inferior, tais como mucosa nasal, bronquial e alveolar (pneumócitos) (WIERSINGA, *et al.*, 2021). Dessa maneira, o SARS-CoV-2 liga a sua estrutura viral, a proteína *spike* (S), no receptor ACE2 da célula do hospedeiro. Este é clivado pela protease serina transmembrana do tipo 2 (*type 2 transmembrane serine protease* - TMPRSS2), permitindo a ativação da proteína S e o processo de endocitose do vírus para o citosol celular. Portanto, a maior avidéz do vírus está relacionada às células com maior quantidade de receptores da ACE2 e TMPRSS2, que participam do processo de internalização viral no organismo do hospedeiro, das células de maior relevância para esta patologia, destacam-se os pneumócitos do tipo II. (WIERSINGA, *et al.*, 2021).

Na infecção pelo SARS-CoV-2, o sistema imune inato é ativado ao reconhecer os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) e os padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) com auxílio dos receptores de reconhecimento de padrões (PPRs), deste último, os receptores *Toll-like* (TLR) e *NOD-like*, embora não os únicos, são grande importância (e serão discutidos na seção abaixo). A forma mais frequente para a liberação dos DAMPs, e consequente ativação dessas vias inflamatórias, é a piroptose (TAY, *et al.* 2020). A presença do material genético do vírus dentro do citoplasma celular, bem como seu mecanismo de replicação, ativa diversas vias e cascatas de sinalização intracelular por fatores de transcrição, como o fator nuclear - *kappa* B (NF- $\kappa$ B), e fatores reguladores de interferon (IRFs) que desencadeiam esse processo de apoptose mediada pela inflamação (TAY, *et al.* 2020; BHARDWAJ, *et al.*, 2022).

Assim, com essa indução do sistema imune inato e adaptativo estimula-se a secreção de citocinas inflamatórias, como a IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, INF- $\gamma$ , proteína induzida pelo interferon  $\gamma$  (IP-10) e proteína-1 quimioatrativa de macrófagos (MCP-1) (SOKOLOWSKA, *et al.*, 2020; BHARDWAJ, *et al.*, 2022). Estas, atuam atraindo as células inflamatórias, como linfócitos, monócitos e neutrófilos até o local da infecção que são capazes de eliminar o patógeno do organismo, além de produzir mais citocinas no local. Em especial, a concentração de IL-1 $\beta$  está elevada e associada fortemente a pacientes com maior intensidade de piroptose celular (HUANG, *et al.*, 2020; TAY, *et al.* 2020). Há casos em que se têm uma desregulação

do sistema imune, com excesso de produção das citocinas pró-inflamatórias, o que favorece a lesões pulmonares e que pode causar insuficiência respiratória, ou lesões em outros órgãos alvo, vista em diversos casos graves de COVID-19 (PERLMAN; DANDEKAR, 2005; BHARDWAJ, *et al.*, 2022). Nestes casos graves, o excesso de citocinas e células inflamatórias geram um estresse oxidativo local, lesando o tecido que gera a perda de função do órgão (PERLMAN; DANDEKAR, 2005; BHARDWAJ, *et al.*, 2022).

Um dos mecanismos que o vírus utiliza para conseguir evadir do sistema imune é suprimindo a resposta do interferon antiviral do tipo 1, que é uma via fundamental para a inibição da replicação viral e eliminação do patógeno. Embora ela seja uma das primeiras linhas de defesa, capaz de prevenir a disseminação do vírus pelo organismo, são descritos baixos níveis dessa molécula em pacientes com COVID-19 grave (BHARDWAJ, *et al.*, 2022).

Em relação a imunidade adaptativa, as células (linfócitos) T participam da resposta imune do hospedeiro contra o vírus, sendo detectadas por volta da primeira semana dos sintomas (TAY, *et al.* 2020). As células CD8+ são fundamentais, atacando as células infectadas pelo vírus, mas as CD4+ também têm sua relevância, recrutando as citotóxicas, além de expressar IFN $\gamma$ , TNF e IL-2, principalmente (TAY, *et al.* 2020). As células B, da mesma forma que as T, aparecem na primeira semana de infecção, tipicamente em resposta à proteína N e em seguida a proteína S do vírus. Dessa maneira a produção de anticorpos contra essas proteínas, tendo papel fundamental na resposta imune do hospedeiro (TAY, *et al.* 2020). Entretanto, a COVID-19 também pode apresentar linfopenia pois, além das células epiteliais, o SARS-CoV-2 pode infectar células do sistema imune, como os linfócitos T, o que leva à desregulação no IFN, apoptose e piroptose induzidas por citocinas, hemofagocitose, sequestro de linfócitos nos pulmões ou outros órgãos, redução da hematopoiese da medula óssea e dano aos órgãos linfoides.

Nos casos mais avançados da doença, quando a replicação viral está acelerada, o dano a barreira alvéolo-capilar pode se intensificar, causando o dano alveolar difuso, associado a liberação aumentada de citocinas inflamatórias e intenso influxo de mais monócitos e neutrófilos (WIERSINGA, *et al.*, 2021). Essa lesão pulmonar pode provocar eventos trombóticos e microtrombóticos, sendo os trombos venosos, tromboembolismo pulmonar e arterial eventos possíveis e graves para os pacientes (WIERSINGA, *et al.*, 2021). Ainda, é possível que ocorra

ativação fulminante da cascata de coagulação e consumo desses fatores, desencadeando o quadro de CIVD (WIERSINGA, *et al.*, 2021).

Portanto, de forma geral, enquanto o vírus tem capacidade replicativa em praticamente qualquer tecido, provoca-se intenso dano celular, principalmente endotelial e epitelial que produz/libera no organismo uma grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias (MEHTAR, *et al.* 2021). Estas, atraem e ativam neutrófilos que, em grande quantidade e com certa disfunção, podem levar a “tempestade de citocinas” (MEHTAR, *et al.* 2021). A diminuição da função da ACE2 e do sistema renina-angiotensina aumentam o quadro inflamatório, levando ao quadro de sepse, insuficiência respiratória com SRAG, eventos tromboembólicos e falência de múltiplos órgãos como eventos graves, por vezes fatais, de pacientes com COVID-19 (MEHTAR, *et al.* 2021). Por fim, como o estado inflamatório e rico em citocinas influencia a resposta imune do hospedeiro e a capacidade, ou não, de controlar a intensidade dela, outras comorbidades subjacentes, como doença cardiovascular, hipertensão, diabetes melitus, obesidade, síndrome metabólica, doença pulmonar, doenças neurodegenerativas, imunodeficiências, doença renal, lesão hepática, entre outras, estão associadas a maiores riscos de complicações da infecção pelo SARS-CoV-2 (FELSENSTEIN, *et al.*, 2020; MEHTAR, *et al.* 2021; WIERSINGA, *et al.*, 2021).

### **2.1.5 TEMPESTADE DE CITOCINAS E SÍNDROME DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA**

A tempestade de citocinas é um termo abrangente que descreve a desregulação imunológica do organismo, com apresentação clínica sistêmica e que cursa com inflamação de múltiplos órgãos, podendo levar a falência deles e até o óbito, caso não seja tratado corretamente (FAJGENBAUM, *et al.*, 2020). O sintoma mais frequentemente encontrado é a febre, mas o paciente pode apresentar fadiga, anorexia, dores de cabeça, *rash* cutâneo, diarreia, artralgia, mialgia e alterações neuropsiquiátricas, ou seja, sinais de inflamação ou lesão em mais sistemas além daquele que apresenta o sítio inicial da lesão (FAJGENBAUM, *et al.*, 2020). Rapidamente os casos podem evoluir com alterações da coagulação, com CIVD, hemorragias, dispneia, hipoxemia, hipotensão, desbalanço homeostático, choque e morte. Em se tratando do sistema

respiratório, a injúria pulmonar pode levar ao DAD e SRAG com insuficiência respiratória grave (HUANG, *et al.*, 2020). Outro sistema muito afetado é o renal, sendo a injúria renal, com insuficiência deste órgão, um grave dano à saúde do paciente (FAJGENBAUM, *et al.*, 2020).

A resposta imune inicial contra a infecção do SARS-CoV-2 em geral, é controlada e efetiva, entretanto, caso a replicação viral seja exacerbada ou se o próprio organismo responde a injúria de uma forma acentuada, há liberação desregulada de citocinas pró-inflamatórias, causando a hipercitocinemia (BHASKAR, *et al.*, 2020). As citocinas que podem ser encontradas em elevadas concentração são, principalmente: IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TGF- $\beta$ , dentre outras (BHARDWAJ, *et al.*, 2022). Além dessas, segundo Bhardwaj e colaboradores (2022), ao estudar o plasma dos pacientes com COVID-19, foram encontradas, também, elevação das IL-2, IL-7, IL-10, MCP-1 e fator de necrose tumoral  $\alpha$ . Em especial, o aumento da IL-6, causa uma hiperamplificação do NF- $\kappa$ B que mantém esses níveis inflamatórios elevados, causando maior risco de mortalidade para os pacientes (HOJYO, *et al.*, 2020). Portanto, essa quantidade e qualidade de citocinas liberadas de forma desreguladas, corrobora o nome da “tempestade de citocinas”.

Esse evento atrai diversas células do sistema imune, especialmente os monócitos e linfócitos para os pulmões ou para o órgão que esteja mais afetado (BHASKAR, *et al.*, 2020). Essas células, então, irão produzir e secretar ainda mais citocinas, tendo como principais as IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , também muito associadas aos pacientes com quadros mais complexos (BHASKAR, *et al.*, 2020; BHARDWAJ, *et al.*, 2022). Isso gera um *feedback* positivo superestimando a liberação dessas citocinas, levando a lesão tecidual no local da inflamação (TAY, *et al.* 2020). A piroptose é mostrada como um evento importante na patogênese das lesões na COVID-19, pois nela há liberação e estímulo de grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias, principalmente a IL-1 $\beta$  e associação com a ativação do inflamassoma NLRP-3 (BHASKAR, *et al.*, 2020). De certo modo, quanto mais células são lesadas, mais resposta inflamatória será provocada, atraindo mais células do sistema imune que irão produzir mais citocinas, causando esse ciclo de estimulação descontrolada com excesso de citocinas no organismo e, possivelmente, lesões à distância.

Além da liberação de citocinas, a ativação do complemento que leva a uma disfunção endotelial, ativa fatores da coagulação, o que leva a eventos tromboembólicos. Os neutrófilos também são recrutados e ativados, tendo a NETose como uma das principais vias de resposta e dano ao

organismo, inclusive, reforçando a ativação das vias intrínsecas e extrínsecas da coagulação. (PEREIRA; PASCOAL-XAVIER, 2021)

Assim, esse excesso de citocinas que alcança a corrente sanguínea levará a disfunção endotelial, dano vascular e desregulação metabólica, causando lesões em múltiplos órgãos, como danos ao miocárdio e a circulação, insuficiência renal, encefalopatia, eventos tromboembólicos, dentre outros (BHASKAR, *et al.*, 2020; TAY, *et al.* 2020; WIERSINGA, *et al.*, 2021). Dessa forma, havendo lesões em órgão alvo em diversos sistemas, desencadeada por processos inflamatórios/infecciosos, tem-se conceitualmente a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) (MARIK; TAEB, 2017).

A SIRS, como estado mais grave do paciente com COVID-19, geralmente se apresenta como febre persistente, sem sítio estabelecido, associado a sinais de envolvimento multisistêmico (RAMOS-CASALS, *et al.*, 2021). Como diversos sistemas podem estar envolvidos, é necessária grande atenção da equipe assistencial para poder fazer o pronto diagnóstico e iniciar as possíveis linhas de tratamento, voltadas principalmente à reduzir os sintomas e os danos das lesões (RAMOS-CASALS, *et al.*, 2021). Como a tempestade de citocinas é um dos substratos patológicos para explicar o início e manutenção da SIRS, têm se visto respostas promissoras ao reduzir a intensidade de inflamação e a concentração de interleucinas circulantes no paciente (BHASKAR, *et al.*, 2020).

### **2.1.6 INFLAMASSOMA NLRP3**

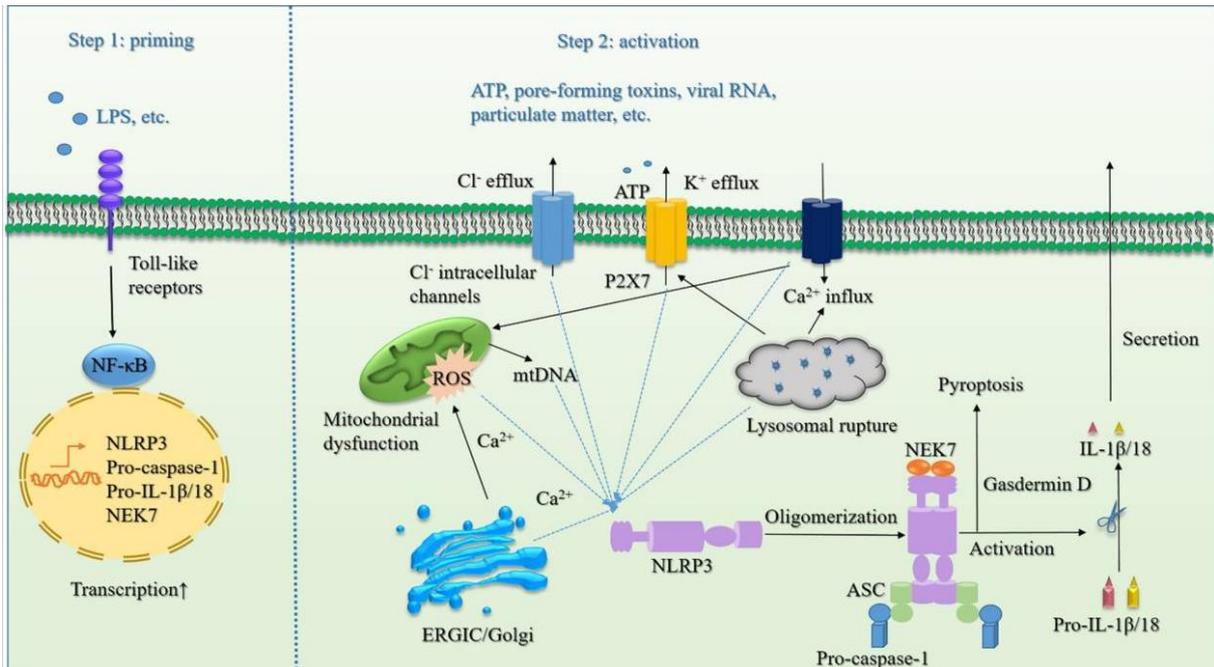
Os inflamassomas são um grupo de complexos proteicos intracitoplasmáticos de células do sistema imune que são formados a partir de uma resposta a um dano celular ou infecção e mediam a ativação de caspases inflamatórias (SCHRODER; JURG, 2010; BROZ; DIXIT, 2016). A iniciação do inflamassoma ocorre quando a ativação do receptor de padrão de reconhecimento (PPR – *patter-recognition receptor*) em resposta, em geral, a algum padrão molecular associado ao patógeno (PAMPs – *pathogen-associated molecular patterns*), ou a alguma lesão endógena celular, aciona a clivagem proteolítica da pró-caspase-1 em caspase-1 e esta converte as pro-interleucina-1 $\beta$  e pró-interleucina-18 nos seus respectivos ativados (HE,

*et al.*, 2016; BROZ; DIXIT, 2016). Essas interleucinas são potentes mediadores pró-inflamatórios, participando de diversos mecanismos inflamatórios, como a quimiotaxia de células imunes e liberação de INF- $\gamma$ , além de induzir a piroptose, uma forma lítica de morte celular programada (HE, *et al.*, 2016; BROZ; DIXIT, 2016).

A estrutura básica dos inflamassomas apresenta um receptor de padrão de reconhecimento (PPR), o sensor e um adaptador (ASC – *apoptosis-associated spec-like proten containing CARD*) que são capazes de ativar a enzima cisteína protease, no caso a caspase-1 (HE, *et al.*, 2016). Dos inflamassomas descritos, o NLRP3, também conhecido como criopirina, é um dos mais estudados por sua relevância no estudo do padrão de resposta inflamatória a infecções bacterianas e virais, além de outros processos, como metabólicos ou neoplásicos (SCHRODER; JURG, 2010; VEERDONK, *et al.*, 2011; ZHAO, *et al.*, 2021).

A ativação clássica do inflamassoma tem o modelo baseado em dois sinais, conforme a figura 4, abaixo (HE, *et al.*, 2016; ZHAO, *et al.*, 2021). O Sinal 1 (a preparação) depende da presença de moléculas do patógeno ou de citocinas endógenas que ativam o fator de transcrição NF- $\kappa$ B e estimulam a síntese do NLRP3 e da pro-IL-1 $\beta$ , principalmente. Depois, o Sinal 2 (ativação), que depende de um leque de estímulos (ATP, toxinas, RNA viral intracitoplasmático, dentre outros), há a ativação diretamente da cascata do inflamassoma NLRP3 (HE, *et al.*, 2016). Para que essa etapa seja ativada e mantida, a maioria dos estímulos do NLRP3 induzem efluxo suficiente de K<sup>+</sup> do citoplasma para o meio extracelular. Além disso, sinais de cálcio causam disfunção mitocondrial, mecanismo que também ativa esse complexo de proteínas (ZOETE, *et al.*, 2014). A soma desses sinais intracelulares têm como objetivo converter a pró-Caspase-1 em caspase-1 que possui a capacidade de clivar as pro-interleucinas em citocinas ativas, no caso a IL-1 $\beta$  e IL-18 (HE, *et al.*, 2016).

**Figura 4 – Esquema da ativação do inflamassoma NLRP3**



**Legenda:** Nesta figura, a parte da esquerda mostra a fase de iniciação do primeiro sinal, em que há estímulo por um PAMP ou DAMP, iniciando a ativação. Ao lado direito, é possível observar o passo 2 da ativação, com clivagem da pro-caspase-1 para caspase-1, o que converte a pro-interleucina em interleucina. A caspase também é responsável por causar disfunção mitocondrial com início do processo de piroptose da célula infectada.

**Fonte:** retirado de ZHAO, *et al.*, 2021.

Enquanto os produtos do inflamassoma (interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-18) contribuem fundamentalmente para a resposta do hospedeiro contra agentes infecciosos, recrutando células inflamatórias, predominantemente macrófagos, linfócitos e neutrófilos, por exemplo (VEERDONK, *et al.*, 2011). A Caspase-1 apresenta outra função: iniciar o processo de piroptose, ou a apoptose mediada pela inflamação (SWANSON, *et al.*, 2019; ZHAO, *et al.*, 2021). Esta, quando ativada, aumenta a permeabilidade da parede da mitocôndria, com liberação dos produtos de espécies reativas de oxigênio (ROS), iniciando o processo de apoptose (HE, *et al.*, 2016). Dessa forma, a célula que está infectada pelo patógeno, ao entrar em morte celular programada, também elimina esse agente.

No caso da infecção pelo SARS-CoV-2, a possível forma de ativação do inflamassoma é pela via canônica (RODRIGUES, *et al.*, 2020; ZHAO, *et al.*, 2021). Sendo mostrado, por Chen e colaboradores (2019), que a produção viral de viroporina pode diretamente ativar o NLRP3 celular do hospedeiro; e Pan e colaboradores (2021) também evidenciaram a ativação do

infalamassoma pela proteína viral N. Assim, de forma direta ou por outros eventos sinalizatórios e/ou moleculares intracelulares, como efluxo de potássio, fluxo de cálcio, ROS, danos mitocondriais ou rupturas de vesículas lisossomais, acontece o início da cascata de reações que ativam a caspase e as interleucina relacionadas (RODRIGUES, *et al.*, 2020; ZHAO, *et al.*, 2021). Como a interação viram e de suas proteínas estruturais com as células do organismo podem ativar o NLRP3, este inflamassoma tem se mostrado relevante como mecanismo de piroptose e mediação inflamatória em pacientes infectados pelo vírus SARS-CoV-2 (RODRIGUES, *et al.*, 2020; ZHAO, *et al.*, 2021).

Como consequência desse evento, a produção final de interleucina IL-1 $\beta$  e IL-18 facilitam a formação da tempestade de citocinas, com liberação de IL6, IL-8, IL-10, IL-1RA, TNF- $\alpha$  e outras citocinas pró-inflamatórias (como discutido anteriormente) (ZHAO, *et al.*, 2021; TAY, *et al.* 2020). A ativação do inflamassoma pode afetar diretamente diversos órgãos: no caso do pulmão, em que a presença dessas citocinas ativa plaquetas, células endoteliais e neutrófilos, lesando a barreira alvéolo-capilar, proporcionando o DAD; no caso do coração, há disfunção endotelial, miocardite e danos às miocélulas; no sistema nervoso, as citocinas podem atravessar a barreira hematoencefálica, atraindo monócitos para o neurópilo, além disso, a própria inflamação sistêmica pode levar a eventos de neurodegeneração pelo estresse oxidativo da disfunção mitocondrial e apoptose (RODRIGUES, *et al.*, 2020; ZHAO, *et al.*, 2021; TAY, *et al.* 2020).

## **2.2 ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DA COVID-19 E AUTÓPSIA**

### **MINIMAMENTE INVASIVA**

O conhecimento da anatomia humana e de como as doenças alteram a morfologia do organismo foram adquiridos ao longo da história por meio da dissecação de corpos após o óbito, as autópsias (DE CAMPOS; ROCHA, 2015). Após a segunda guerra mundial os patologistas, agentes responsáveis pelas necropsias hospitalares, ficaram reconhecidos por diversas descobertas para a ciência e para o entendimento do mecanismo de morte dos pacientes (DE CAMPOS; ROCHA, 2015). Dessa maneira, com o surgimento de doenças emergentes, este estudo das alterações morfológicas de pacientes que foram a óbito por elas, ajuda a entender

como os processos patológicos atuam neste organismo e, com isso, é possível planejar métodos de diagnóstico e tratamento mais eficazes.

No final do ano de 2019, a pandemia do novo coronavírus teve seu início e com ela, novos desafios para o sistema de saúde. Devido ao seu alto risco de contágio, o exame tradicional de autópsia foi contraindicado na maioria dos locais, com exceção dos centros com nível de biossegurança 3 (Li, *et al.*, 2005). Este nível, que apresenta áreas consideradas limpas, semi contaminadas e contaminadas, com filtros especiais, controle de pressão de cada sala e fluxo de ar laminar, contém a segurança mínima necessária para que os profissionais (técnicos de necropsia e patologistas, por exemplo), possam exercer as técnicas necessárias do estudo das autópsias (Li, *et al.*, 2005). Como há uma escassez desse tipo de espaço em grandes centros de saúde no Brasil, novas técnicas para a realização de necrópsia ganham espaço (DUARTE-NETO, *et al.*, 2019; MONTEIRO, *et al.*, 2020). É neste cenário que o uso da coleta de material *post-mortem* por meio de agulhas grossas, guiada por exames de imagens, a autópsia minimamente invasiva (MIA, do inglês *minimally invasive autopsy*) se torna uma alternativa com resultados relevantes (DUARTE-NETO, *et al.*, 2019; MONTEIRO, *et al.*, 2020)).

O procedimento da autópsia minimamente invasiva é realizado, geralmente, por um patologista com o auxílio de um técnico, mas radiologistas, médico intensivistas ou outras especialidades também podem participar da técnica (CASTILLO, *et al.*, 2015; WAGENSVELD, *et al.*, 2019). Nela, são colhidas amostras de coração, pulmão, fígado, baço, rins e qualquer outro órgão ou área de interesse, guiados por aparelho de ultrassonografia e podem ser coletadas fluidos ou líquidos de cavidades, quando necessário (CASTILLO, *et al.*, 2015). Outros métodos de imagem, como a ressonância magnética (RM), tomografia computadorizada (TC) e a própria radiografia também podem ser métodos de auxílio para a coleta das amostras, quando disponíveis nos centros hospitalares (BLOKKER, *et al.*, 2018; WAGENSVELD, *et al.*, 2019). Em geral, utiliza-se agulha de 14 ou 16 *Gauge*, guiados pelo método de imagem de escolha, para a coleta do material, podendo ser de uma localização pré-estabelecida ou em alguma área suspeita de lesão, uma condensação pulmonar, por exemplo (CASTILLO, *et al.*, 2015). Após essa coleta, os materiais são processados com as técnicas laboratoriais para exame histológico tradicional e, por fim, seguem o fluxo de análise e diagnóstico para a confecção do laudo anatomopatológico da necrópsia (CASTILLO, *et al.*, 2015; WAGENSVELD, *et al.*, 2019).

Embora as autópsias convencionais (AC) sejam consideradas o padrão-ouro para diagnósticos *post-mortem*, a MIA é uma alternativa confiável, principalmente em regiões com alto risco de doenças infectocontagiosas (DUARTE-NETO, *et al.*, 2019; CASTILLO, *et al.*, 2016). De forma geral, os achados colhidos nas amostras da MIA, em comparação com as AC foram suficientes para o diagnóstico semelhante, bem como os materiais são suficientes para estudos moleculares, quando necessário (BLOKKER, *et al.*, 2018; DUARTE-NETO, *et al.*, 2019). A MIA apresenta alto índice de sensibilidade de diagnósticos de causas de morte, principalmente quando métodos de imagem tipo TC ou RM são associados à ultrassonografia e, principalmente, quando embasadas com dados clínicos completos (BLOKKER, *et al.*, 2016; FERNANDES, *et al.*, 2019). Inclusive, durante o surto de febre amarela, no ano de 2018, em São Paulo foram realizadas MIA em pacientes que foram a óbito pela febre hemorrágica, sendo apresentado 100% de concordância entre os resultados da autópsia minimamente invasiva e do método convencional na determinação da causa do óbito e da causa base do paciente (DUARTE-NETO, *et al.*, 2019).

Dessa maneira, para entender como a infecção do vírus agride o organismo humano e com base nos estudos de necrópsia de pacientes que foram a óbito pela COVID-19, os principais achados histopatológicos descritos na literatura serão descritos abaixo.

O principal órgão afetado pela infecção do SARS-CoV-2 é o pulmão, apresentando majoritariamente o dano alveolar difuso (DAD) (CHAMS, *et al.*, 2020; WIERSINGA, *et al.*, 2021; PEREIRA; PASCOAL-XAVIER, 2021). Este órgão é rico em receptores da ACE2, o que favorece ainda mais o risco e a intensidade das lesões (MEHTAR, *et al.*, 2021). Esta lesão apresenta-se em diversos estágios, sendo que na fase inicial há edema, espessamento difuso da parede alveolar, com formação de membrana hialina revestindo a parede alveolar que perdeu parte dos pneumócitos do tipo 1, depósito de fibrina e infiltrado inflamatório predominantemente de mononucleares (CHAMS, *et al.*, 2020; WIERSINGA, *et al.*, 2021; PEREIRA; PASCOAL-XAVIER, 2021). É geralmente nesta fase e por conta dos aspectos morfológicos descritos, que ao exame de imagem pela TC, apresenta o aspecto em “vidro fosco” e é nessa fase que há maior risco para o desenvolvimento de SRAG (WIERSINGA, *et al.*, 2021). Há hiperplasia de pneumócitos do tipo 2, na fase proliferativa, com formação de tecido de granulação e proliferação dos fibroblastos (CHAMS, *et al.*, 2020; BÖSMÜLLER, *et al.*, 2021; PEREIRA; PASCOAL-XAVIER, 2021). Na fase final ou fibrótica, observa-se organização da fibrina, com fibrose de padrão cicatricial obstruindo os alvéolos, o que restringirá a troca gasosa

(CHAMS, *et al.*, 2020; BÖSMÜLLER, *et al.*, 2021; PEREIRA; PASCOAL-XAVIER, 2021). Também são possíveis encontrar inclusões nucleares virias, presença de megacariócitos e eventos vasculares, como focos de endotelialite e vasculite, congestão, trombos e microtrombos, hemorragia intralveolar e áreas de necrose (BÖSMÜLLER, *et al.*, 2021; VALDIVIA-MAZEYRA, *et al.*, 2021). Ainda, a presença de infecções secundárias, como pneumonia lobar ou broncopneumonia irá ser caracterizada por intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear e exudato no interior dos alvéolos (PEREIRA; PASCOAL-XAVIER, 2021)

No sistema circulatório, o achado macroscópico mais típico foi a hipertrofia ventricular, com dilatação predominantemente das cavidades direitas (MONDELLO, *et al.*, 2021; TABARY, *et al.*, 2020). Microscopicamente há infiltrado inflamatório de mononucleares focal e edema (MONDELLO, *et al.*, 2021). Outras alterações, como áreas de fibrose cicatricial antiga, trombose coronariana ou placas de ateroma também são descritos (MONDELLO, *et al.*, 2021; TABARY, *et al.*, 2020).

No sistema urinário, o achado histológico mais frequente é o dano tubular agudo (ou necrose tubular aguda – NTA) (MONDELLO, *et al.*, 2021). O SARS-CoV-2 pode infectar diretamente as células dos glomérulos, causando glomerulopatias, sendo encontrada a glomerulopatia colapsante, um tipo distinto de glomeruloesclerose segmentar e focal (PEREIRA; PASCOAL-XAVIER, 2021). A presença de infiltrado inflamatório intersticial, microangiopatia trombótica, grânulos de hemossiderina e fibrose também podem ser avaliados (MONDELLO, *et al.*, 2021; TABARY, *et al.*, 2020; CARAMASCHI, *et al.*, 2021). Outras lesões secundárias a outros processos, como pielonefrite aguda e atrofia tubular, podem ser encontradas (MONDELLO, *et al.*, 2021).

No fígado, são observadas degeneração dos hepatócitos, com necrose focal, o que explicaria a elevação de aminotransferases em alguns pacientes com COVID-19, congestão com possíveis microtrombos, fibrose do trato portal e infiltrado inflamatório misto com ou sem atividade de interface (TABARY, *et al.*, 2020). A presença de colestase, proliferação ductular, hipertrofia de células de Kupffer e eventos vasculares e/ou trombóticos também podem ser apreciadas (MONDELLO, *et al.*, 2021; CARAMASCHI, *et al.*, 2021). Além disso, em frequentes casos, observam-se áreas de esteatose hepática, de padrão macrofolicular, em geral de intensidade leve a moderada (MONDELLO, *et al.*, 2021; PEREIRA; PASCOAL-XAVIER, 2021). No trato gastrointestinal, a presença de infiltrado inflamatório pode ser observada em correspondência a

infecção do vírus, mas também foram relatados casos de isquemia mesentérica secundária a infecção do SARS-CoV-2 (MONDELLO, *et al.*, 2021; TABARY, *et al.*, 2020; PEREIRA; PASCOAL-XAVIER, 2021).

No sistema nervoso, foram encontradas partículas virais do SARS-CoV-2 no lobo frontal, nas células endoteliais e no líquido cefalorraquidiano (LCR) (TABARY, *et al.*, 2020; PEREIRA; PASCOAL-XAVIER, 2021). Morfológicamente, raramente observa-se infiltrado inflamatório ou dano celular, mas pode-se encontrar áreas de hemorragia na substância branca e formação de nódulos de células microgliais ativadas (TABARY, *et al.*, 2020; PEREIRA; PASCOAL-XAVIER, 2021).

A pele pode apresentar uma plethora de achados ao exame clínico e histológico, variando desde exantemas virais até manifestações de vasculopatia (MONDELLO, *et al.*, 2021; TABARY, *et al.*, 2020). Histologicamente, pode haver dermatite com atividade dermo-epidérmica, vacuolização dos ceratinócitos basais (espongiose) e focos perivascularares e perianexiais de infiltrado inflamatório mononuclear, predominantemente linfocitário (TABARY, *et al.*, 2020; PEREIRA; PASCOAL-XAVIER, 2021). Em casos graves da infecção, também podem ser encontrados necrose da epiderme e anexos cutâneos e microtrombos de fibrina (PEREIRA; PASCOAL-XAVIER, 2021)

No sistema imune, o baço apresenta importante diminuição da polpa branca, com atrofia linfocitária e redução da população de linfócitos B, áreas de hemorragia da polpa vermelha e figuras de hematofagocitose vírus (MONDELLO, *et al.*, 2021; TABARY, *et al.*, 2020; PEREIRA; PASCOAL-XAVIER, 2021). A medula óssea geralmente está apresenta hiperplasticidade e aumento dos focos de mielopoiese e linhagem megacariocítica evidenciando alterações de maturação vírus (MONDELLO, *et al.*, 2021; TABARY, *et al.*, 2020; PEREIRA; PASCOAL-XAVIER, 2021).

Por fim, nos sistemas genitais e placenta, o SARS-CoV-2 foi encontrado no sêmen e, histologicamente observam-se células inflamatórias, predominantemente linfócitos, no interstício testicular, bem como aumento das células de Sertoli e redução das células de Leydig (MONDELLO, *et al.* 2021; PEREIRA; PASCOAL-XAVIER, 2021). Na placenta, são observados infiltrado inflamatório misto, rico em neutrófilos e monócitos, no espaço subcorial

e no cordão umbilical, microtrombos, vasculopatia e focos intervilosos de deposição de fibrina (TABARY, *et al.*, 2020; PEREIRA; PASCOAL-XAVIER, 2021).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 GERAL**

Caracterizar aspectos histopatológicos e o inflamassoma NLRP3 na COVID-19 fatal.

#### **3.2 ESPECÍFICOS**

- A- Caracterizar as lesões patológicas em amostras de pulmão, coração, fígado, baço e rins coletadas por autópsia minimamente invasiva;
- B- Detectar o SARS-CoV-2 em amostras de tecido por imuno-histoquímica;
- C- Avaliar a expressão de integrantes do inflamassoma NLRP3 por imuno-histoquímica;
- D- Correlacionar aspectos clínicos e histopatológicos com o inflamassoma NLRP3.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 APRECIÇÃO ÉTICA**

Este trabalho de mestrado representa parte do projeto APM-COVID-19 - Estudo anatomopatológico de fatores prognósticos da COVID-19 fatal por meio da autópsia minimamente invasiva, que está aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP) e Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) centros coparticipantes, com o número identificador CAAE: 31585420.6.0000.5149 e o número do parecer: 4.085.663. O estudo seguiu todas as normas de pesquisas envolvendo seres humanos contidas na Resolução 466 de 2012 do Conselho Nacional de Saúde. Conforme a Resolução CNS 466/12 e, em respeito à Lei da Biodiversidade (Lei 13.123), declara-se que este trabalho não contempla acesso ao patrimônio genético (PGN). O projeto recebeu apoio financeiro do Programa INOVA FIOCRUZ, por meio do Edital INOVA Geração de Conhecimento. A outra parte do projeto foi destinada à defesa de mestrado de Barbosa (2022), em trabalho desenvolvido no Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou / FIOCRUZ Minas e intitulado “Estudo clinicopatológico de fatores prognósticos da COVID-19 fatal”.

### **4.2 TIPO DE PESQUISA**

Trata-se de estudo primário, unicêntrico e observacional, do tipo transversal e descritivo, realizado no Centro de Tratamento Intensivo do Hospital Eduardo de Menezes (HEM) – FHEMIG, Serviço de Imuno-histoquímica do Instituto René Rachou – FIOCRUZ Minas e Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG, com período de inclusão de participantes para a coleta dos materiais, por meio da autópsia minimamente invasiva, entre os meses de junho e novembro do ano de 2020.

### **4.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO**

O trabalho incluiu participantes, após consentimento livre e esclarecido autorizado pelos seus familiares, admitidos no HEM-FHEMIG com suspeita clínica ou diagnóstico confirmado de COVID-19 e que foram notificadas aos sistemas de vigilância epidemiológica da SMS/PBH e SES/MG, por meio de testes moleculares ou sorológicos, e que evoluíram para óbito durante internação hospitalar. O projeto incluiu participantes com idade superior a 18 anos que foram admitidos no Centro de Tratamento Intensivo do Hospital Eduardo de Menezes (HEM) - FHEMIG.

Como critérios de exclusão, não foram incluídos os seguintes participantes: gestantes; participantes soropositivos para HIV/AIDS; e participantes portador de doença crônica terminal.

Considerando estudos prévios internacionais e nacionais para validação do procedimento minimamente invasivo, bem como definições dos índices epidemiológicos no contexto da pandemia COVID-19 durante a coleta de dados para o trabalho, foi obtida amostra de conveniência de 50 participantes.

### **4.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO**

#### **4.4.1 PROCEDIMENTO DA AUTÓPSIA MINIMAMENTE INVASIVA**

O procedimento minimamente invasivo de amostragem *post-mortem* de tecidos e líquidos corporais, com o auxílio de técnicas de imagem, foi recentemente validado como alternativa para investigação ou verificação da causa do óbito em contexto hospitalar, com disponibilidade de informações clínicas e acesso a alterações morfológicas dos órgãos afetados sem a complexidade de uma autópsia tradicional aberta (LI, *et al.* 2005; DUARTE-NETO, *et al.* 2019; BLOKKER, *et al.* 2018; CASTILO, *et al.* 2016; PALHARES, *et al.* 2019). Devido ao elevado risco de contágio e as contraindicações para a realização de autópsias tradicionais durante os primeiros anos da pandemia do SARS-CoV-2, essa técnica mostrou-se uma alternativa para os

centros que não dispunham das normas de biossegurança mínimas exigidas, o Nível de Biossegurança 3. Neste trabalho, o procedimento fez uso de agulhas de padrão TRU CUT ou Coaxial 14 *Gauge* e, em casos necessários, 16 *Gauge*, para punção e biópsias localizadas dos órgãos e tecidos: pulmões bilateralmente, coração, fígado, rins bilateralmente e baço. O tipo e as principais características das diferentes agulhas utilizadas no procedimento minimamente invasivo para cada biópsia em particular, além dos locais de punção e o número indicado de amostras estão resumidos na Tabela 1 (FERNANDES, *et al.* 2019). O procedimento foi orientado por ultrassonografia portátil, que permitiu melhor localização e avaliação dos órgãos, bem como a indicação/orientação das topografias para as coletas do material (áreas de lesão e áreas de coleta padrão, como seguem as informações da tabela). A equipe do CTI do HEM/FHEMIG, membros da equipe do projeto (um radiologista e um intensivista), realizaram estes procedimentos de acordo com o fluxo interno do hospital e recomendações da coordenação da unidade (WAGENSVELD, *et al.* 2019; BLOKKER, *et al.* 2018). O tempo após a declaração de óbito do paciente e a coleta das amostras não excedeu 30 minutos, tendo em vista a necessidade de agilidade na liberação dos leitos de CTI durante o período com maior número de internações da pandemia e permitindo que o material esteja em sua forma mais viável possível para fixação e análise destas.

**Tabela 1 – Características das biópsias teciduais no procedimento minimamente invasivo dos órgãos alvo do projeto**

<b>Tecido</b>	<b>Agulha</b>	<b>Gauge</b>	<b>Comprimento (mm)</b>	<b>Local</b>	<b>Frasco formol 10%</b>
<b>Coração</b>	Automática	14	100	Punção 5º espaço intercostal da região torácica esquerda	2 cilindros
<b>Pulmão D</b>	Automática	14	100	Punção espaços intercostais da região torácica direita	4 cilindros
<b>Pulmão E</b>	Automática	14	100	Punção espaços intercostais da região torácica esquerda	4 cilindros
<b>Fígado</b>	Manual	14	115	Punção 11º espaço intercostal na linha axilar anterior direita	4 cilindros
<b>Rim D</b>	Automática	14	160	Punção na área lombar superior à direita	4 cilindros
<b>Rim E</b>	Automática	14	160	Punção área lombar superior à esquerda	4 cilindros
<b>Baço</b>	Automática	14	160	Punção 11º espaço intercostal na linha axilar lateral direita	4 cilindros

**Legenda:** as topografias das coletas, de acordo com cada órgão alvo, suas respectivas agulhas e suas características são mostradas nesta tabela. A orientação padrão para coleta foi mantida em todas as coletas, entretanto houve casos em que mais coletas puderam ser realizadas quando, ao exame de imagem, fosse identificada mais lesões nestes órgãos.

**Fonte:** elaborado pelo autor

Em seguida à coleta, as biópsias foram encaminhadas ao Laboratório de Imunologia de Doenças Virais, que conta com Nível de Biossegurança 2, e Serviço de Imuno-histoquímica, ambos da FIOCRUZ Minas, para processamento tecidual e confecção de lâminas histológicas para coloração histoquímica (HE e colorações especiais) e ensaios imuno-histoquímicos, conforme recentes evidências científicas sobre o procedimento (BLOKKER, *et al.* 2016; PALHARES, *et al.* 2019; FERNANDES, *et al.* 2019; CASTILLO, *et al.* 2015).

#### 4.4.2 EXAME HISTOPATOLÓGICO E CRITÉRIOS DE ANÁLISE

As lâminas histológicas com cortes teciduais seriados e corados pelas técnicas histoquímicas HE, PAS, Grocott, Giemsa e Retículo foram analisadas para descrição e classificação das lesões histopatológicas observadas, segundo parâmetros das lesões patológicas gerais. Para isso, as lâminas histológicas, de cada topografia coletada, foram escaneadas e suas imagens virtuais analisadas, via programa de computador CASEVIEWER da empresa 3DHISTECH, por meio de critérios de adequabilidade do material e de lesões comuns em revisões da literatura de processos patológicos semelhantes. As análises foram realizadas pelo autor e seu orientador, bem como por uma equipe de patologistas professores da UFMG, seguindo os critérios pré-estabelecidos acima.

Os principais critérios de adequabilidade foram baseados em aqueles pré-estabelecidos para cada tecido, na literatura, em estudos de doenças prévias. O termo “representatividade” será usado quando a amostra cumpriu os critérios estabelecidos na literatura e aqueles pré-estabelecidos pela equipe deste trabalho, ou seja, quando a amostra foi “bem sucedida”, está “adequada” e “suficiente” para análise histológica e imuno-histoquímica. A tabela abaixo (tabela 2) mostra os critérios utilizados, com cada referência, para a avaliação de representatividade dos tecidos coletados por meio da técnica da autópsia minimamente invasiva.

Tabela 2 – Critérios de representatividade de acordo com a topografia/órgão

Órgão	Critério de representatividade	Referências
<b>Coração</b>	Presença de tecido cardíaco ou lesão	SUVARNA (Ed.), 2019
<b>Pulmão</b>	Presença de parênquima pulmonar ou lesão	CORRIN, ANDREW, 2011
<b>Fígado</b>	Contagem de 10 ou mais tratos portais	CHOLONGITAS, <i>et al.</i> 2006
<b>Rins</b>	Contagem mínima de 15 a 20 glomérulos	LUCIANO, MOECKEL, 2019
<b>Baço</b>	Presença de parênquima esplênico	TABARY, <i>et al.</i> 2020

**Legenda:** padronização dos critérios para análise de representatividade das amostras. Foram utilizadas referências em artigos científicos e livros texto consolidados que descrevem, em biópsias *in vivo*, os critérios mínimos para considerar a amostra representativa do órgão para o diagnóstico de processos patológicos.

**Fonte:** elaborado pelo autor.

Além dos critérios acima, utilizando a função de medida do *CaseViewer*, foram medidos todos os comprimentos e larguras (sendo calculado o valor da área) dos fragmentos examinados. Tendo cumprido com os critérios de representatividade, os processos patológicos foram avaliados e quantificados. Para cada topografia, as lesões mais típicas foram catalogadas e organizadas, fazendo uso de um sistema de graduação binário (presente ou ausente) ou qualitativo (ausente, discreto, moderado e acentuado), conforme a necessidade. Assim, do pulmão foram avaliados: dano alveolar difuso, edema intersticial alveolar, infiltrado linfocitário intersticial, hiperplasia reativa de pneumócitos, células gigantes multinucleadas, megacariócitos capilares alveolares, microtrombos vasculares arteriolares, espessamento intersticial alveolar, hemorragia alveolar pulmonar, vasculite necrotizante, vasculite não necrotizante, inflamação bronquiolar e brônquica, broncopneumonia aguda (aspiração ou infecção secundária), broncopneumonia *acuta* (NOSa) e pneumonia organizante. Para o coração, foram analisadas: miocardite, necrose focal de miócitos, infiltrado inflamatório miocárdico focal, miocardite borderline, cardiomiopatia inflamatória, macrófagos intersticiais, alterações isquêmicas, infarto do miocárdio, edema intersticial, infiltrado linfocitário epicárdico, trombose arterial microvascular e trombose venosa microvascular. Para o fígado, foram avaliados: congestão centrolobular, fígado do choque, esteatose, necrose e apoptose de hepatócitos, infiltrado linfocitário e colestase. Para o baço, foram avaliados: hemorragia e congestão, hemofagocitose, trombose arterial e vasculite, hemorragia da polpa vermelha, granuloma necrotizante, depleção linfocitária, atrofia da polpa branca, necrose do parênquima e esplenite aguda. Por fim, as análises do rim foram: necrose tubular aguda, nefrite intersticial, lesão endotelial e microtrombos, necrose cortical, infarto, rabdomiólise e acúmulos de pigmentos tubulares, glomerulopatia colapsante, glomerulonefrite e pielonefrite.

#### 4.4.3 EXAME IMUNO-HISTOQUÍMICO

Para a detecção imuno-histoquímica do SARS-Cov-2 nas amostras de tecido, foi empregado o produto *Coronavirus pan Monoclonal Antibody* (FIPV3-70) na diluição de 1/100 em PBS. Para o estudo imuno-histoquímico dos integrantes do inflamassoma NLRP3, foram realizadas as avaliações dos alvos IL-1 $\beta$ , IL-18, Caspase 1 e NLRP3. Todos os anticorpos são provenientes do fabricante Santa Cruz Biotechnology e apresentam especificações conforme descrições da Tabela 3.

**Tabela 3 – Anticorpos utilizados para marcação imuno-histoquímica do inflamassoma**

<b>Anticorpo primário</b>	<b>Marcação</b>	<b>Clone</b>	<b>Fabricante</b>
Anti-IL1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$	2h12: sc-130323	Santa Cruz Biotechnology, INC
Anti-IL18	Interleucina 18	H173: sc-7954	Santa Cruz Biotechnology, INC
Anti-Caspase 1	Caspase 1	14F468: sc-56036	Santa Cruz Biotechnology, INC
Anti-NLRP3	NLRP3	Cryopyrin-H-66: sc-66846	Santa Cruz Biotechnology, INC

Fonte: elaborado pelo autor

As lâminas com cortes parafinados de 4  $\mu$ m dos blocos de tecido serão desparafinizadas em xilol e reidratadas em álcool. A recuperação da antigenicidade foi feita pelo aquecimento a 90°C no vapor por 20 minutos em solução tampão 10mM Tris EDTA (pH 9,0) e em solução tampão de citrato de sódio (pH 6,0). A coloração para imuno-histoquímica foi feita com os anticorpos primários diluídos em PBS. A peroxidase endógena foi bloqueada e as lâminas foram lavadas em solução tampão. Foram adicionados 100  $\mu$ L do anticorpo primário, na diluição informada, por 50 minutos, em temperatura ambiente em câmara úmida. Por fim, os cortes foram lavados com PBS e incubados com *Novolink Polymer Detection Systems Kit* (Leica Biosystems), de acordo com as especificações do fabricante.

Na análise da imuno-histoquímica anti-coronavírus, a imunorreatividade foi considerada detecção positiva. As análises de estudo imuno-histoquímico do inflamassoma NLRP3, quando qualitativos, avaliaram, para cada anticorpo, a intensidade e o percentual da imunorreatividade de marcação, de acordo com os parâmetros da tabela, abaixo:

**Quadro 1 – Critérios de intensidade e percentual de análise das amostras de imuno-histoquímica**

Intensidade		Percentual	
<b>0</b>	Ausente	<b>0</b>	Ausente
<b>1</b>	Leve ou uma cruz (+)	<b>1</b>	Menor que 25%
<b>2</b>	Moderado ou duas cruces (++)	<b>2</b>	Menor que 50%
<b>3</b>	Intensa ou três cruces (+++)	<b>3</b>	Menor que 75%
		<b>4</b>	Menor ou igual a 100%

**Legenda:** modelo de análise das intensidades. Ao analisar a lâmina pela técnica de imuno-histoquímica esses escores foram utilizados para o escore final que foi usado nos cálculos estatísticos de positividade ou negatividade de cada anti-corpo.

**Fonte:** adaptado de MENDES *et al.*, 2020.

Para as análises de estudo imuno-histoquímico, quando semi-quantitativos, um escore foi estabelecido, baseado no percentual e intensidade da imunomarcção (TAKANO, *et al.* 2016). Dessa forma, multiplicamos os graus de intensidade da marcação com o percentual de tecido positivo, conforme a tabela 4, abaixo. Os valores em menores do que 3 são considerados expressão “basal” (destacados em azul na tabela abaixo) e os valores iguais ou acima de “4” foram considerados com “hiperexpressão” (destacados em vermelho na tabela). Sendo assim, interpretados, finalmente, como “hiperexpressão” (1) e expressão “basal” (0). Foram utilizadas, para controle negativo da reação imuno-histoquímica, peles de mamoplastia que apresentam negatividade para hiperexpressão dos reagentes citados acima; e para os controles positivos, foram utilizadas peles com diagnóstico positivo para hanseníase que, de forma já esperada, já apresentará positividade para os anticorpos do estudo.

**Quadro 2 – Critérios de escore final da análise das amostras de imuno-histoquímica**

Intensidade	Percentual				
	0	1	2	3	4
0	0	0	0	0	0
1	0	1	2	3	4
2	0	2	4	6	8
3	0	3	6	9	12

**Legenda:** modelo de análise dos escores finais das análises de imuno-histquímica.

**Fonte:** adaptado de MENDES *et al.*, 2020.

#### 4.5 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados histopatológicos e imuno-histoquímicos obtidos por meio das avaliações dos materiais foram armazenados em planilhas eletrônicas utilizando o programa EXCEL. Este material foi submetido às análises estatísticas descritivas, comparativas e de acurácia utilizando-se os softwares Minitab 17 e GraphPad Prism versão 6.00. Para análises comparativas foi empregado o teste T de Student para dados paramétricos e o teste de Mann Whitney para dados não paramétricos, além do teste de Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Tukey, para dados paramétricos e o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns para dados não paramétricos. Correlações entre parâmetros clínico-laboratoriais e os parâmetros fenotípicos da doença foram avaliadas pelos testes de Correlação de Pearson ou Spearman. A análise de regressão linear múltipla foi utilizada para investigar a associação entre a gravidade da COVID-19 e as alterações histopatológicas. Essas análises multivariadas foram realizadas usando a função R (*Project for Statistical Computing Version 3.0.1*). As diferenças estatisticamente significativas são consideradas quando o valor de p for menor que 0,05.

## 5 RESULTADOS

O estudo avaliou amostras de 50 participantes que foram coletadas em procedimentos de autópsia minimamente invasiva no Centro de Terapia Intensiva do Hospital Eduardo de Menezes - FHEMIG.

Conforme demonstrado na dissertação de Barbosa (2022), os participantes foram internados no hospital com diagnóstico confirmado de síndrome respiratória de etiologia por SARS-CoV-2, tendo os dados dos prontuários colhidos para a análise epidemiológica. Daqueles pacientes que foram ao óbito, a idade média foi de 65 anos, variando de 60 a 76 (tabela 4), e eram majoritariamente do sexo masculino (n=26; 52%) (tabela 5). As comorbidades mais prevalentes foram: 41 (82%) dos 50 participantes informaram hipertensão arterial sistêmica, 27 (54%) dos 50 informaram Diabetes Mellitus, 26 (56,5%) de 46 eram obesos (o IMC não foi registrado e o dado - Obesidade - foi informação escrita no prontuário do participante por membros da equipe profissional assistente) e, na sequência, doenças pulmonares e cardiovasculares (tabela 6).

**Tabela 4 – Características demográficas dos participantes – proporção de idade entre os participantes**

Características (n = 50)	Mediana	(Q1 – Q3)
Idade (anos)	65	(60 - 76)

**Legenda:** distribuição de idade entre os participantes do estudo. A idade mediana dos pacientes foi de 65 anos de idade.

**Fonte:** BARBOSA, 2022.

**Tabela 5 – Proporção entre os sexos dos participantes**

Sexo (n = 50)	n	%
Masculino	26	52,0
Feminino	24	48,0

**Legenda:** distribuição entre os gêneros dos pacientes. É possível notar uma discreta predominância de pacientes do sexo masculino entre os participantes do estudo.

**Fonte:** BARBOSA, 2022.

**Tabela 6 – Proporção das comorbidades dos participantes**

<b>Comorbidades (%Sim)</b>	<b>sim</b>	<b>%</b>
DM (n = 50)	27	54
HAS (n = 50)	41	82
Obesidade (n = 46)	26	56,5
DPOC (n = 49)	9	18,4
Asma (n = 49)	3	6,1
Tabagismo (n = 48)	2	4,2
Doença Pulmonar geral (n = 50)	14	28
Doença Coronariana prévia (n = 50)	5	10
Insuficiência cardíaca prévia (n = 50)	7	14
Arritmia (n = 49)	4	8,2
Doença cardíaca prévia (n = 50)	11	22
AVC prévio (n = 50)	5	10
Doença Renal crônica (n = 48)	4	8,3
Doença hepática crônica (n = 50)	1	2

**Legenda:** tabela com as proporções de comorbidades de participantes do estudo. Doenças como diabetes melitus, hipertensão arterial sistêmica e obesidade estiveram entre as comorbidades mais encontradas nos pacientes. Outras doenças, destacando-se aquelas que afetam o trato respiratório, como doença pulmonar obstrutiva crônica, asma e tabagismo, também foram encontradas nos participantes.

**Fonte:** BARBOSA, 2022.

De cada participante foram colhidas amostras dos seguintes órgãos: pulmão direito, pulmão esquerdo, coração, rim direito, rim esquerdo e baço. Assim que os materiais foram processados e as lâminas escaneadas, foram avaliadas a representatividade histológica e as lesões histopatológicas.

## 5.1 VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO DA AUTÓPSIA MINIMAMENTE INVASIVA (MIA)

### 5.1.1 REPRESENTATIVIDADE HISTOLÓGICA

Considerando os critérios de avaliação de representatividade das amostras, as amostras de pulmão direito e esquerdo foram consideradas, em sua maioria, representativas para o estudo histopatológico (Tabela 7).

**Tabela 7 – Pulmão direito e esquerdo: quantidade de amostras representativas**

Representatividade	Pulmão direito		Pulmão esquerdo	
	n	Percentual (%)	n	Percentual (%)
<b>Sim</b>	43	86	42	84
<b>Não</b>	7	14	8	16
<b>Total</b>	50	100	50	100

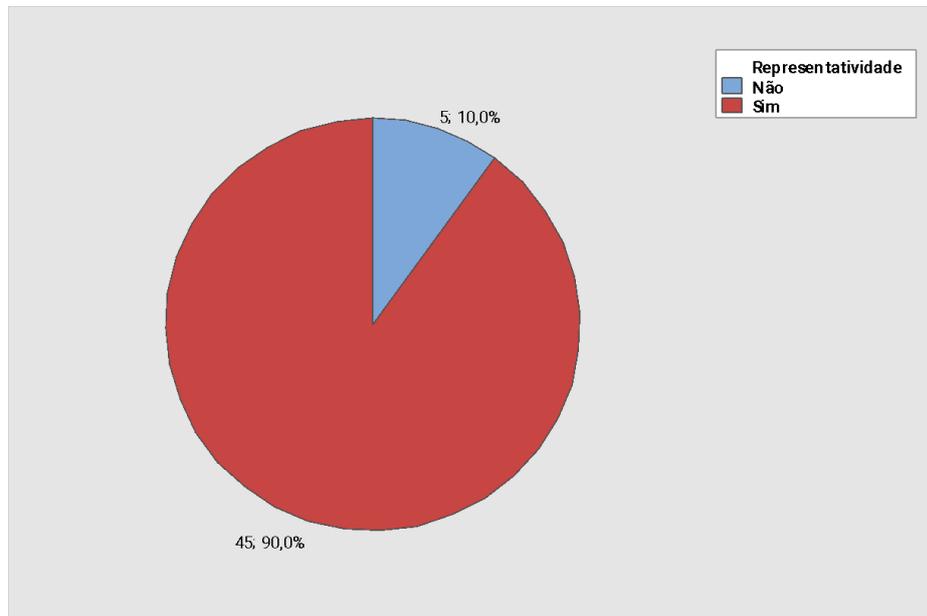
**Legenda:** tabela com as quantidades de amostras e suas porcentagens em relação a representatividade ou não. As amostras foram representativas em 86% e 84% nos pulmões direito e esquerdo, respectivamente.

**Fonte:** elaborado pelo autor

Dentre as 50 amostras coletadas de pulmão direito, 43 (86%) foram representativas. Um número muito semelhante foi alcançado com as amostras de pulmão esquerdo, sendo 42 (84%) representativas. Aquelas que não foram representativas nos pulmões direito (n = 7) e esquerdo (n = 8), não foram analisadas morfológicamente devido à inexistência de fragmentos de parênquima pulmonar.

As amostras de coração também foram majoritariamente representativas. O gráfico abaixo mostra as quantidades e percentuais da representatividade das amostras cardíacas.

**Gráfico 1 – Coração: quantidade de amostras representativas**

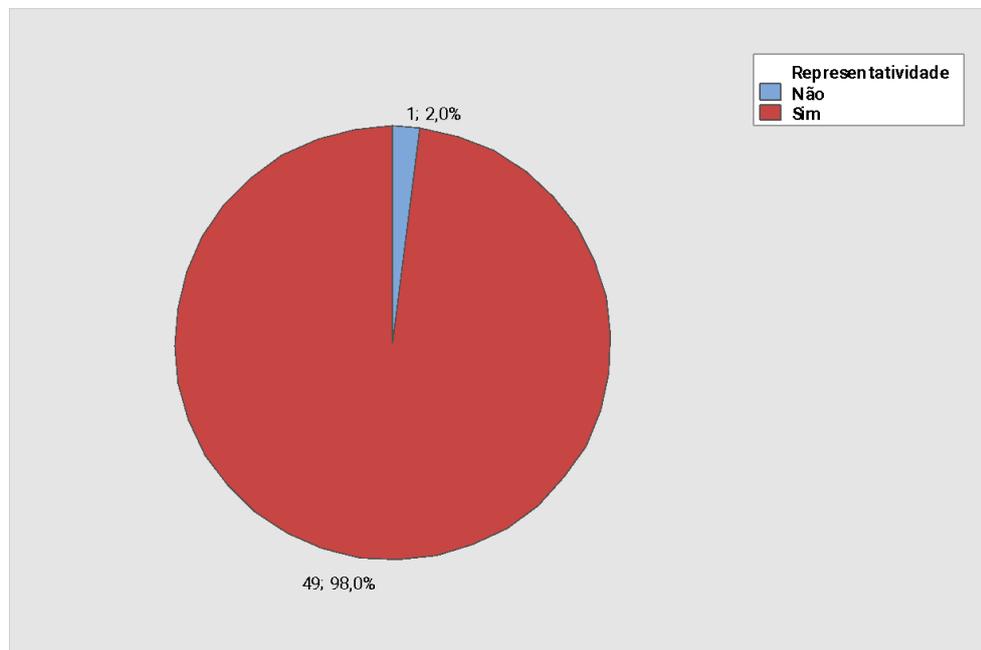


**Legenda:** as amostras de coração apresentaram-se majoritariamente representativas. Dessa forma, a análise histológica e estatística pôde ser realizada em 45,9% das amostras.

**Fonte:** Elaborado pelo autor

Das amostras de fragmentos cardíacos, tivemos 45 (90%) dos 50 casos representativos.

As amostras de parênquima hepático apresentaram a maior representatividade, com 49 (98%) casos representativos, como mostrado no gráfico abaixo.

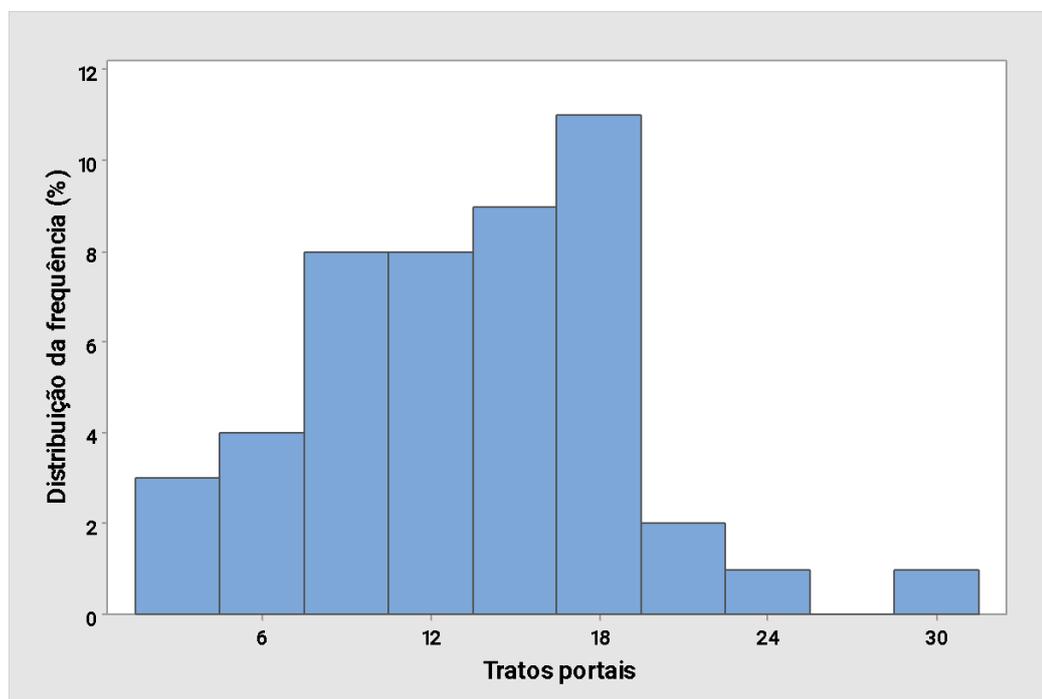
**Gráfico 2 – Fígado: quantidade de amostras representativas**

**Legenda:** as amostras de fígado apresentaram-se majoritariamente representativas. Dessa forma, a análise histológica e estatística pôde ser realizada em 49,98% das amostras.

**Fonte:** elaborado pelo autor.

Para a análise de representatividade do fígado, foram utilizados os critérios de quantidade mínima de tratos portais, pré-estabelecidos anteriormente (Vide METODOLOGIA – Exame Histopatológico e Critérios de Análise, páginas 42-44). A distribuição da contagem dos tratos portais nas amostras de fígado está representada no Gráfico 3.

**Gráfico 3 – Fígado: distribuição de frequência de quantidade dos tratos portais nos fragmentos**

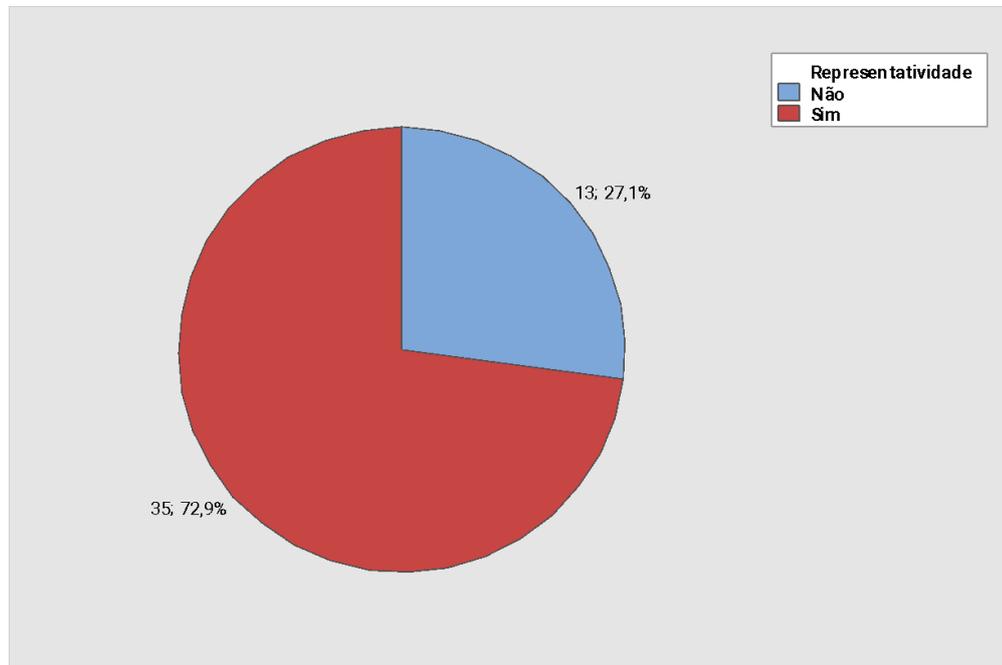


**Legenda:** a quantidade de tratos portais é fundamental para a avaliação de representatividade de uma biópsia hepática. Neste gráfico, é possível notar que a maioria dos casos possui 10 ou mais tratos portais, o que é considerado como uma amostra suficiente para a análise das alterações hepáticas.

**Fonte:** elaborado pelo autor

Pelo gráfico, foi possível notar que a maioria dos casos apresentou mais do que os 10 tratos portais preconizados para considerar a amostra como representativa. O número mínimo nas amostras foi de 3 tratos portais e a contagem máxima de 30 tratos portais. A média da contagem de todos os casos foi de 13,4 tratos portais, com o desvio padrão dos casos em 5,5 tratos portais.

O baço obteve 35 (72,92%) de amostras representativas de 48 amostras colhidas. O gráfico abaixo ilustra a representatividade desse órgão no trabalho.

**Gráfico 4 – Baço: quantidade de amostras representativas**

**Legenda:** as amostras de esplênicas apresentaram-se majoritariamente representativas. Dessa forma, a análise histológica e estatística pôde ser realizada em 72,9% das amostras.

**Fonte:** elaborado pelo autor

As amostras dos rins, direito e esquerdo, também apresentaram elevada representatividade. O rim direito obteve mais amostras representativas, chegando a 40 (80%) amostras, enquanto o rim esquerdo obteve 34 (68%) das amostras como representativas.

**Tabela 8 – Rins direito e esquerdo: quantidade de amostras representativas ou não**

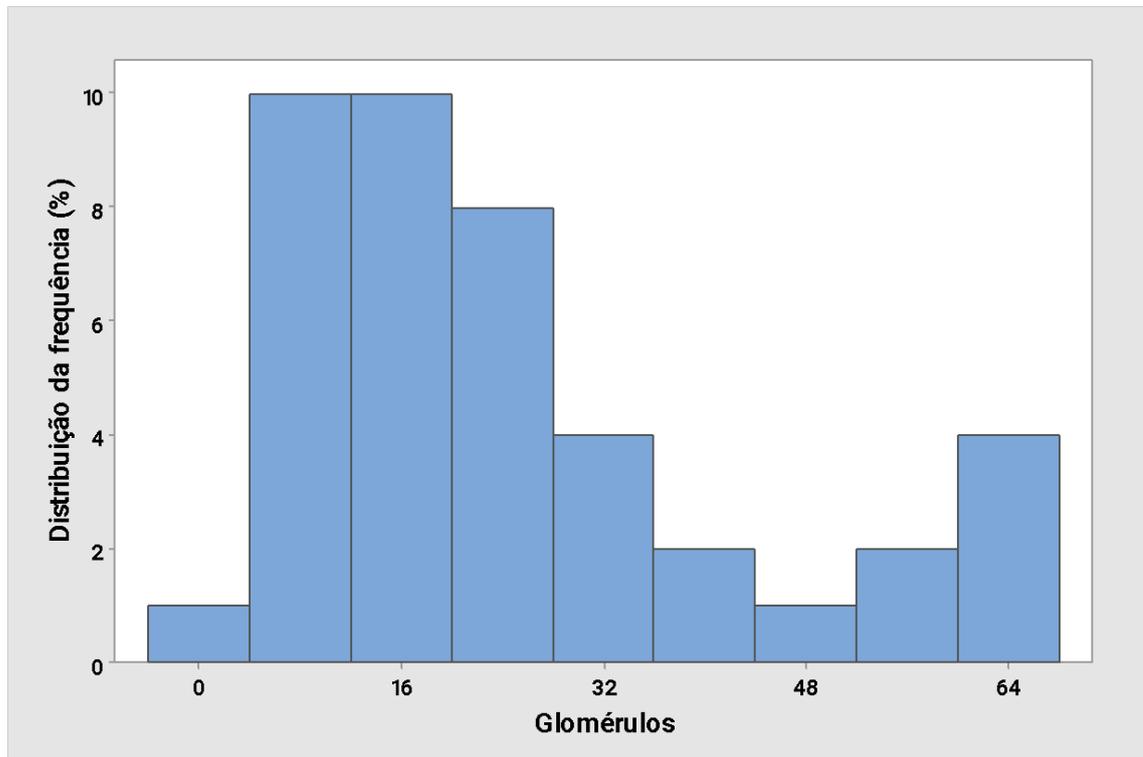
Representatividade	Rim direito		Rim esquerdo	
	n	Percentual (%)	n	Percentual (%)
<b>Sim</b>	40	80	34	68
<b>Não</b>	10	20	16	32
<b>Total</b>	50	100	50	100

**Legenda:** tabela com as quantidades de amostras e suas porcentagens em relação a representatividade ou não. As amostras foram representativas em 80% e 68% nos rins direito e esquerdo, respectivamente.

**Fonte:** elaborado pelo autor

Nas amostras do rim direito, a contagem de glomérulos corroborou o critério de representatividade do parênquima renal. O Gráfico 5 detalha a distribuição de frequência das quantidades de glomérulos encontradas nas amostras das biópsias renais.

**Gráfico 5 – Rim direito: distribuição da frequência da contagem de glomérulos**



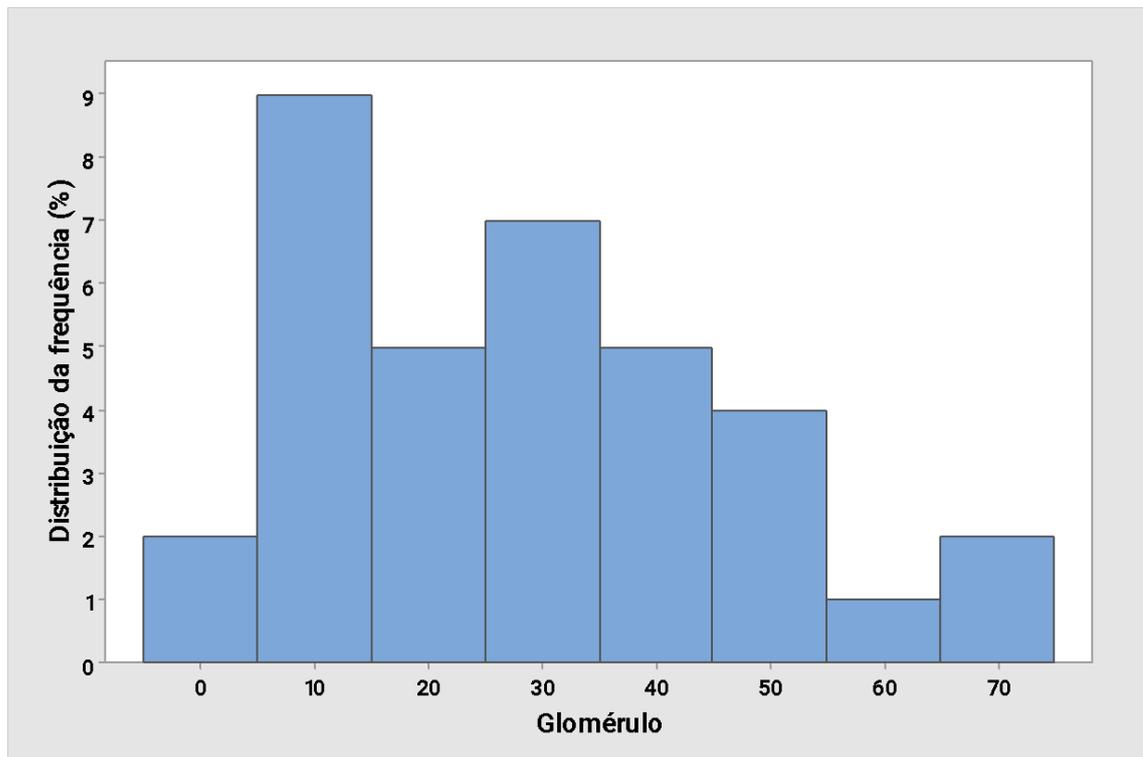
**Legenda:** assim como nas amostras hepáticas, em que a quantidade de tratos portais é fundamental, a quantidade de glomérulos mostra a representatividade do parênquima renal disponível para avaliação histológica mínima. Neste gráfico, é possível notar que a maioria dos casos de amostras do rim direito possui ao menos 16 ou mais glomérulos, dado suficiente para análise das maiorias dos processos patológicos renais.

**Fonte:** elaborado pelo autor

Da contagem de glomérulos das amostras do rim direito, a contagem mínima foi de 1 glomérulo no fragmento estudado e a contagem máxima foi de 66 glomérulos. A média desses valores foi de 24,86 glomérulos amostrados, número maior que o critério adotado para classificação das amostras como representativas.

Em relação a contagem de glomérulos do rim esquerdo, o Gráfico 6 detalha a frequência de distribuição das quantidades dessas estruturas nas amostras de biópsias renais.

**Gráfico 6 – Rim esquerdo: distribuição da frequência da contagem de glomérulos**



**Legenda:** assim como nas amostras hepáticas, em que a quantidade de tratos portais é fundamental, a quantidade de glomérulos mostra a representatividade do parênquima renal disponível para avaliação histológica mínima. Neste gráfico, é possível notar que a maioria dos casos de amostras do rim esquerdo possui ao menos 10 ou mais glomérulos, dado suficiente para análise das maiorias dos processos patológicos renais.

**Fonte:** elaborado pelo autor

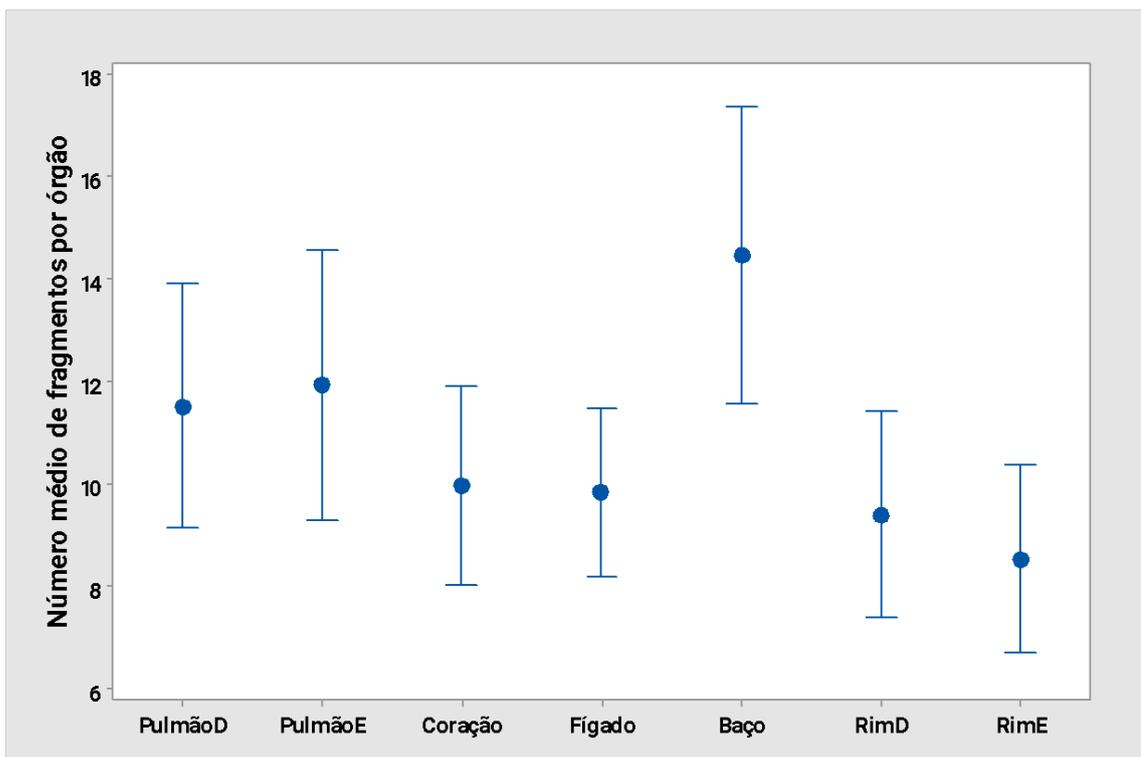
Da contagem de glomérulos das amostras do rim esquerdo, a contagem mínima também foi de 1 glomérulo no fragmento estudado e a contagem máxima chegou a 70 glomérulos. A média desses valores foi de 8 glomérulos amostrados, com desvio padrão que chega a 5,4 glomérulos. Esse valor médio de glomérulos também superou o critério indicado de representatividade das amostras para análise morfológica.

### 5.1.2 NÚMERO DE FRAGMENTOS

Do número médio de fragmentos por órgão, o pulmão direito apresentou uma média de 11,52 fragmentos com desvio padrão de 7,86 fragmentos; e o pulmão esquerdo média de 11,93 fragmentos, com desvio padrão de 8,30 fragmentos. Os valores mínimos e máximos de

fragmentos do pulmão direito foram de 1 e 26, respectivamente. No pulmão esquerdo, os valores mínimos e máximos 1 e 29 fragmentos, respectivamente. O coração apresentou média de 9,98 fragmentos, com desvio padrão de 6,5 e valores mínimos e máximos de 1 e 22, respectivamente. A amostra de fígado teve média de 9,8 fragmentos, com desvio padrão de 5,8 e número mínimo e máximo de 2 e 21 fragmentos, respectivamente. O baço revelou média de 14,46 fragmentos, desvio padrão de 8,42 e valores mínimos e máximos de 8 e 36 respectivamente. Por fim, as amostras renais: o rim direito teve média de 9,4 fragmentos, com desvio padrão de 6,3, e valores mínimos e máximos de 1 e 23 fragmentos, respectivamente; e o rim esquerdo 8.5 fragmentos de média, 5,4 de desvio padrão e 1 e 22 fragmentos de valores mínimos e máximos respectivamente. O Gráfico 7 mostra o número médio de fragmentos obtidos nos procedimentos de autópsia minimamente invasiva, por topografia:

**Gráfico 7 – Número médio de fragmentos por órgão**



**Legenda:** o número médio de fragmentos mostra a quantidade de acessos realizados para coleta de material, o sucesso da coleta, bem como a friabilidade do material. A média esteve próxima entre todas as topografias, mostrando uma tendência de números de fragmentos, com diferença apenas para o parênquima esplênico, que apresentou maior número de fragmentos coletados quando comparado com os demais órgãos.

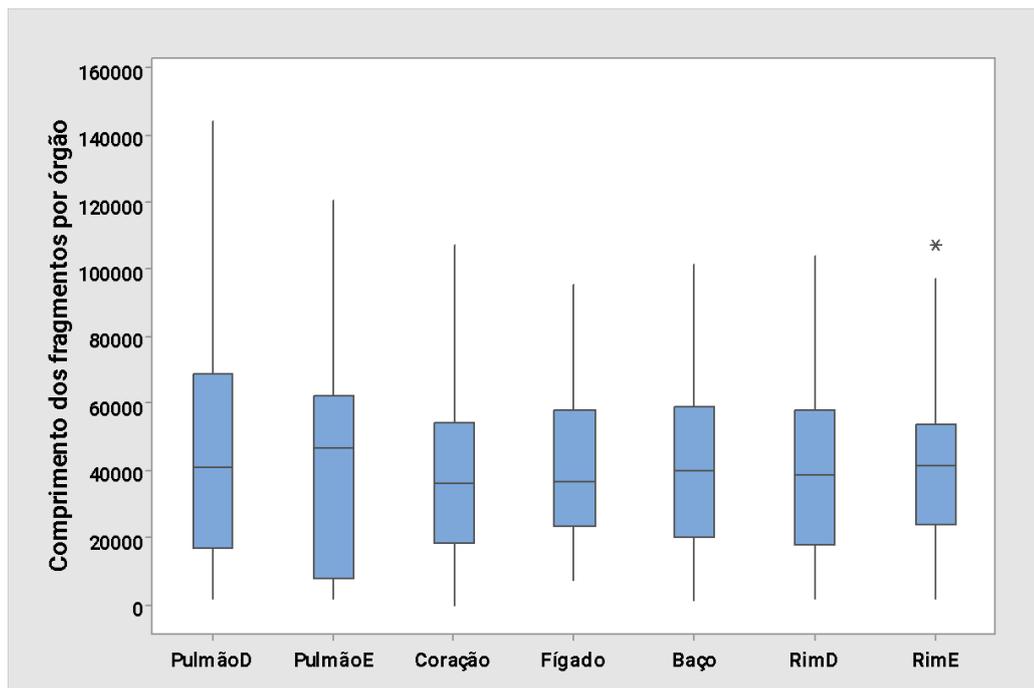
**Fonte:** elaborado pelo autor

De forma geral, os órgãos bilaterais apresentaram valores bem próximos entre si e sem diferença estatisticamente significativa. O coração e o fígado também apresentaram médias aproximadas de fragmentos. O baço apresentou número médio mais elevado de fragmentos, em comparação com as outras topografias.

### 5.1.3 MEDIDA DOS FRAGMENTOS

O Gráfico 8 resume e ilustra os valores das medidas dos fragmentos obtidos de cada órgão, permitindo comparar os valores médios de comprimento de todas as topografias.

**Gráfico 8 – Comprimento total médio dos fragmentos por órgão**



**Legenda:** o gráfico acima representa as medidas em comprimento/área, é possível notar uma padronização das medidas, em que as amostras de pulmão apresentam a maior variação, mas as médias entre todas as topografias é semelhante.

**Fonte:** elaborado pelo autor

As amostras de pulmão direito tiveram o comprimento médio de 45018 micrômetros (9003,6 micrômetros<sup>2</sup> em área), com os valores variando de 2080 até 144396 micrômetros. O pulmão esquerdo apresentou uma média de 42090 micrômetros de comprimento (8418 micrômetros<sup>2</sup>

em área), com valores mínimos e máximos de 1792 e 120411 micrômetros, respectivamente. As amostras de coração mostraram a média de 3794 micrômetros em comprimento (758,8 micrômetros<sup>2</sup> em área), com 18655 e 107565 micrômetros de valores mínimos e máximos, respectivamente. O fígado teve medidas de comprimentos em 3271 micrômetros de média (654,2 micrômetros<sup>2</sup> em área), valor mínimo de 7192 micrômetros e máxima de 95351 micrômetros. O parênquima esplênico mediu 41758 micrômetros em média de comprimento (8351,6 micrômetros<sup>2</sup> em área), tendo 1524 e 101247 micrômetros de mínimo e máximo comprimentos, respectivamente. Por fim, o rim direito teve 4010 micrômetros de comprimento de média (802 micrômetros<sup>2</sup> em área), variando de 2185 micrômetros mínimos e 103963 micrômetros máximos; e o rim esquerdo com 42718 micrômetros de média (8543,6 micrômetros<sup>2</sup> em área), 1776 micrômetros de comprimento mínimo e 107336 micrômetros de comprimento máximo.

## 5.2 DESCRIÇÃO DAS VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS

As variáveis histopatológicas foram analisadas e as frequências e intensidades de cada lesão, para cada topografia foram dispostas em tabelas. Inicialmente, foram examinadas e quantificadas as principais lesões pulmonares.

**Tabela 9 – Tipo, graduação e frequência das lesões pulmonares**

<b>Lesão</b>	<b>Graduação</b>	<b>n</b>	<b>Porcentagem (%)</b>
Dano Alveolar Difuso (DAD)	0	16	35,56
	1	8	17,78
	2	18	40,00
	3	3	6,67
Edema Intersticial Alveolar	0	20	44,44
	1	19	42,22
	2	6	13,33
	3	0	0,00
Infiltrado Linfocitário Intersticial	0	11	24,44
	1	22	48,89
	2	9	20,00
	3	3	6,67

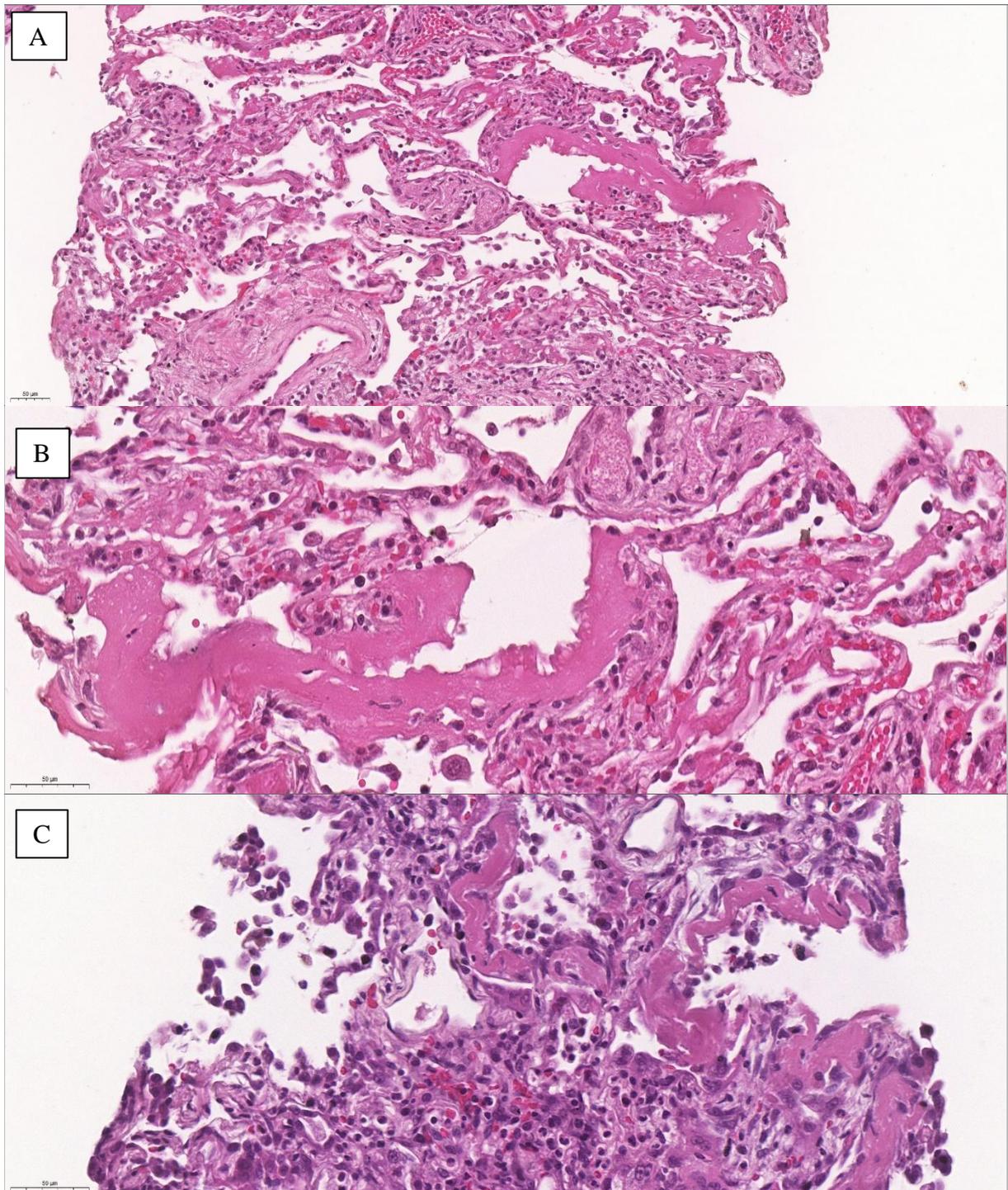
Lesão	Gradação	n	Porcentagem (%)
Hiperplasia Reativa dos	0	11	24,44
Pneumócitos	1	21	46,67
	2	12	26,67
	3	1	2,22
Células Gigantes	0	39	86,67
Multinucleadas	1	6	13,33
Megacariócitos capilares	0	34	75,56
alveolares	1	11	24,44
Microtrombos	0	40	88,89
vasculares arteriolares	1	2	4,44
	2	2	4,44
	3	1	2,22
Espessamento	0	13	28,89
Intersticial Alveolar	1	18	40,00
	2	12	26,67
	3	2	4,44
Hemorragia Alveolar	0	9	20,00
Pulmonar	1	15	33,33
	2	18	40,00
	3	3	6,67
Vasculite necrotizante	0	45	100,0
e/ou vasculite não necrotizante	1	0	0,00
Inflamação Bronquiolar	0	45	100,00
e Brônquica	1	0	0,00
Broncopneumonia acuta	0	39	86,67
(secundária)	1	6	13,33
Broncopneumonia acuta	0	37	82,22
(NOS)	1	7	15,56
Pneumonia Organizante	0	39	86,67
(BOOP)	1	6	13,33

**Legenda:** tabela com os tipos de lesões, graduações e suas frequências nas amostras pulmonares. O dano alveolar difuso foi a lesão mais encontrada, em diversas fases desse processo patológico; outras alterações relevantes como proliferação de pneumócitos tipo 2, hemorragia intra-alveolar e presença de infiltrado inflamatório também foram caracterizados nesta tabela. Além disso, processos secundários, como pneumonia aguda foram descritos.

**Fonte da tabela:** desenvolvido pelo autor

A lesão mais frequentemente encontrada nas análises morfológicas foi o dano alveolar difuso (DAD), que estava presente em 64,45% dos participantes, sendo a graduação 2 (ou moderada) da intensidade a mais prevalente (40%). A fase proliferativa (em organização) foi a mais encontrada (30%), onde foram observados, além do infiltrado inflamatório rico em linfócitos, moderada a acentuada hiperplasia de pneumócitos tipo 2, espessamento septal com fibrina desorganizada e edema. A hemorragia intra-alveolar também foi achado frequente (80%), nem sempre relacionada diretamente à identificação de trombos em vasos arteriais ou venosos nas

lâminas examinadas. A presença de megacariócitos intra-alveolares e raras células gigantes multinucleadas também foram evidenciadas (13,33 e 24,44%, respectivamente). As infecções pulmonares (não virais), representadas morfológicamente com intenso exsudato fibrino-purulento rico em neutrófilos intra-alveolares também foram encontradas (28,89%), sendo feita a diferenciação entre as pneumonias sem outras especificações e aquelas que são secundárias, como as por aspiração. Abaixo, são apresentadas imagens das alterações histopatológicas encontradas nas amostras pulmonares e uma breve descrição morfológica de cada.

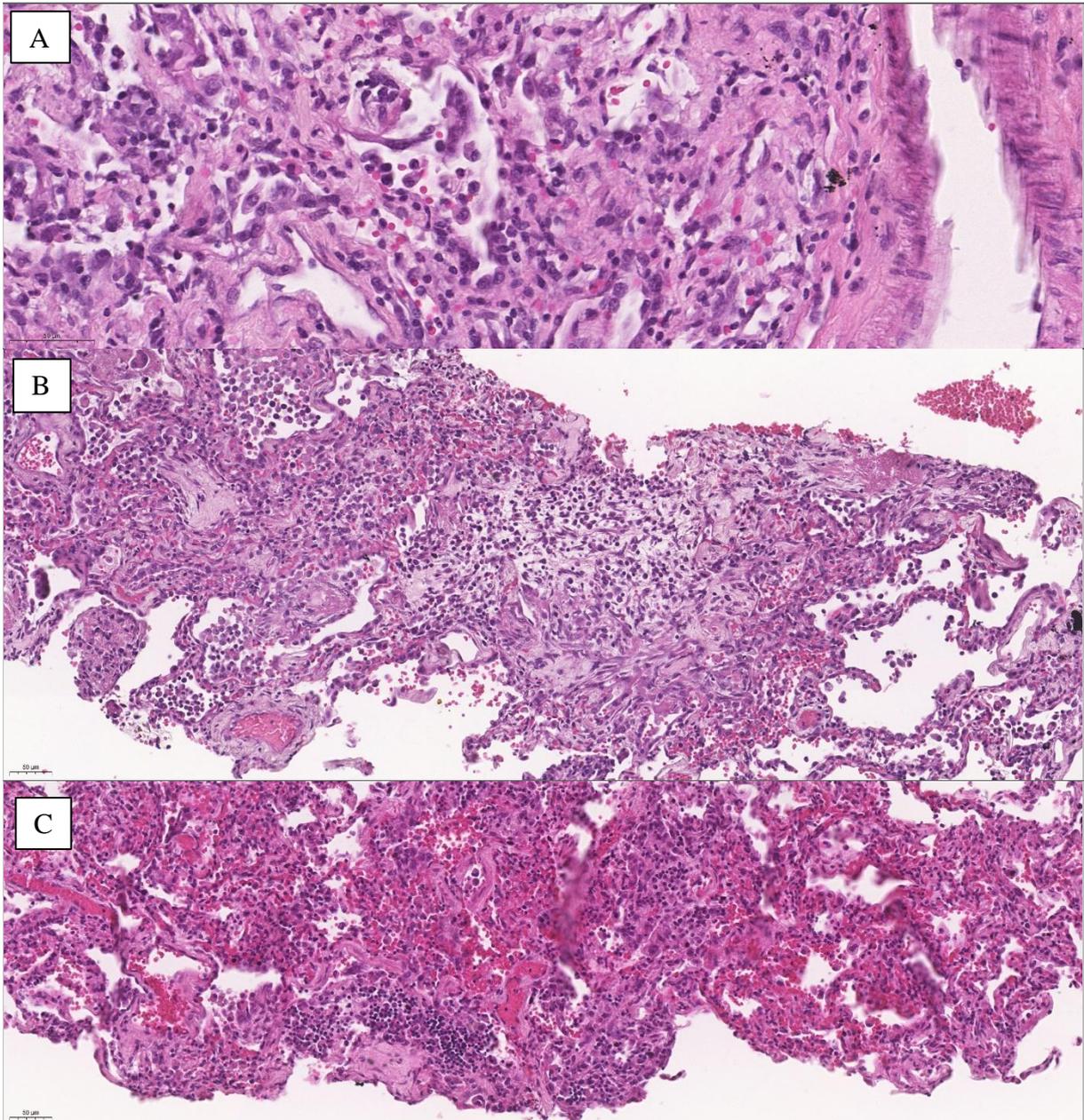
**Figura 5 – Aspectos histopatológicos pulmonares: DAD**

**Legenda:** Presença de Dano Alveolar Difuso (DAD) em fragmentos pulmonares. As figuras A, B e C, nos aumentos de 20x, 40X e 40X, respectivamente, mostram dano alveolar difuso na fase de exsudativa, com intensa produção de membrana hialina, (note ao lado direito da imagem A e C, e ao lado esquerdo da imagem B), a concentração de material amorfo eosinofílico envolvendo o espaço alveolar (membrana hialina).

O dano alveolar difuso, lesão mais prevalente e associada a causa de óbito dos participantes pela COVID-19, apresenta-se morfológicamente como um depósito de material eosinofílico, acelular, revestindo as paredes descamadas dos alvéolos. Na fase exsudativa, foi observada

intensa formação de membrana hialina. Na fase proliferativa, foi observada formação de fibrose organizada no espaço intersticial. As imagens abaixo, caracterizam exatamente esses processos, ocorrendo nos participantes estudados.

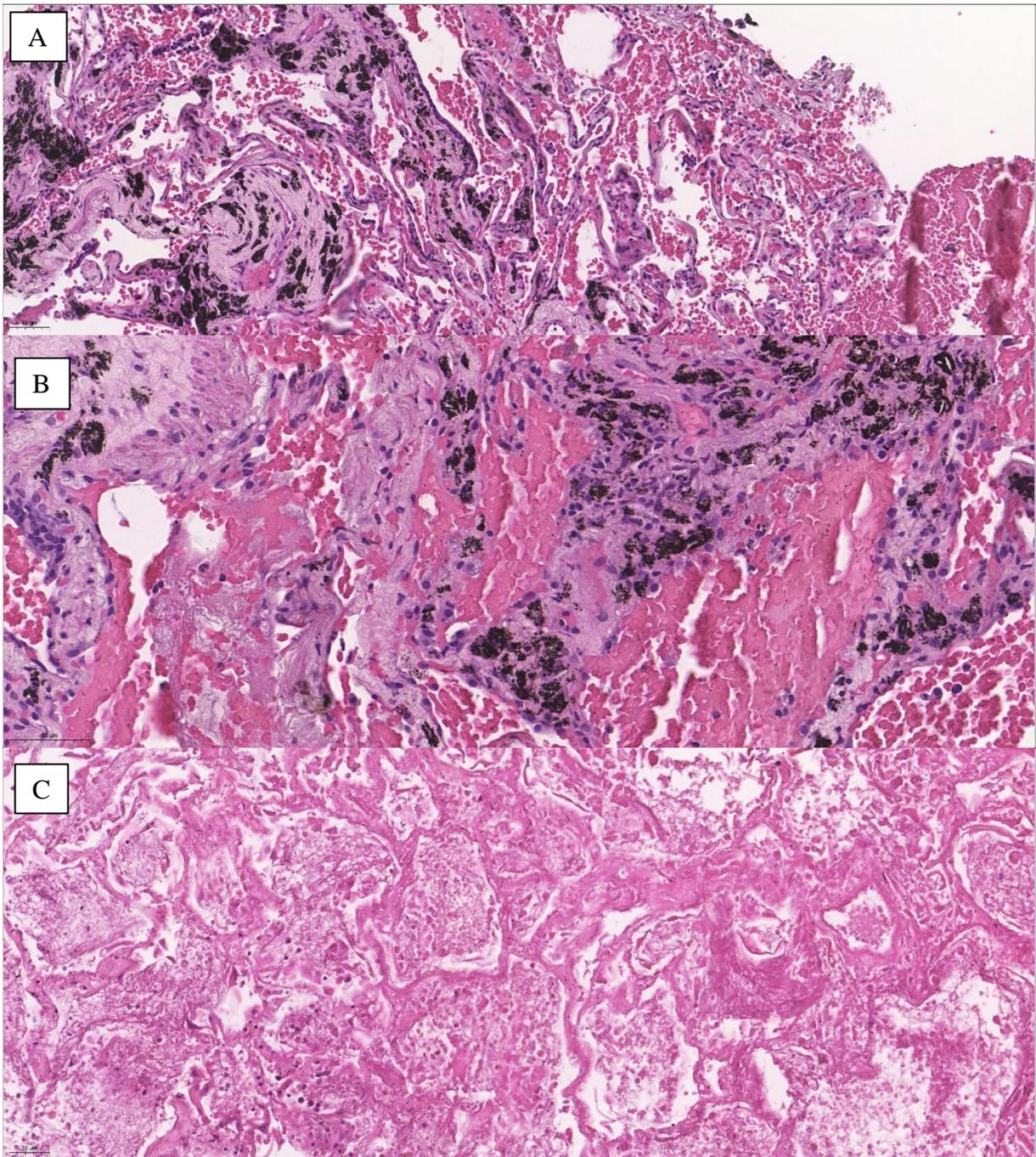
**Figura 6 – Aspectos histopatológicos pulmonares: hiperplasia de pneumócitos tipo 2, fibrose intersticial e infiltrado intersticial associado a hemorragia**



**Legenda:** A figura A mostra hiperplasia de pneumócitos tipo 2, em aumento de 40X. Note a presença destas células, com citoplasma mais amplo, revestindo a parede alveolar (centro da imagem), inclusive com áreas de descamação. A imagem B, revela a fase fibrosante do DAD, em aumento de 20x; nesta, há áreas de deposição de fibrina desorganizada/organizada, ocupando o espaço intersticial do parênquima pulmonar. A imagem C, em aumento de 20X, mostra moderado infiltrado inflamatório, predominantemente mononuclear intersticial e áreas de hemorragia intralveolar, representado pelas hemácias e plasma ocupando os alvéolos.

Em algumas amostras de participantes com evidência de doença pulmonar prévia, foi observada deposição de fibras de colágeno e tecido conjuntivo mais organizado, formando grandes feixes entre áreas de parênquima preservado. Outros achados histológicos encontrados foram a hemorragia intra-alveolar e a necrose do parênquima (Figura 7).

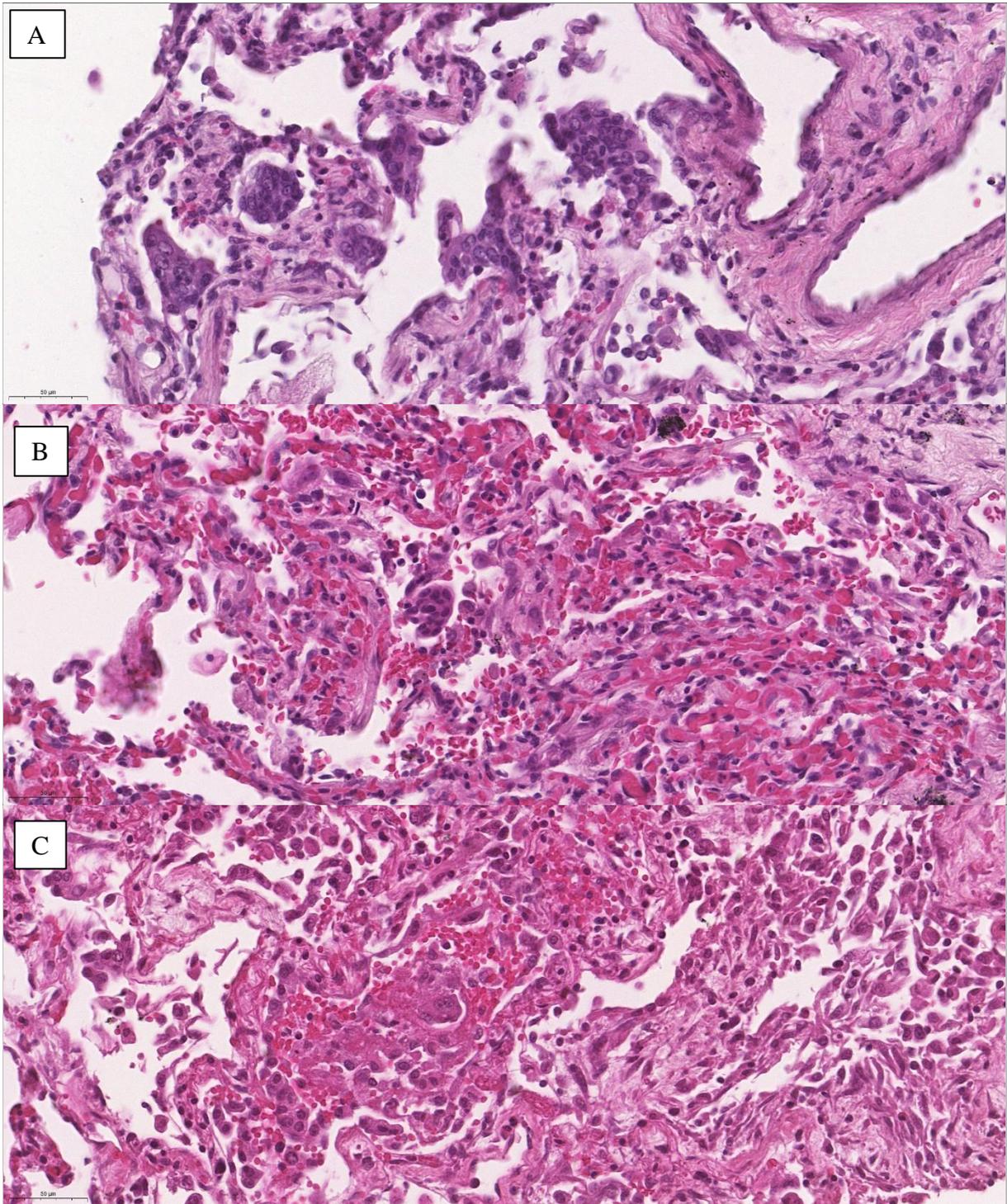
**Figura 7 – Aspectos histopatológicos pulmonares: hemorragia intra-alveolar e necrose do parênquima**



**Legenda:** As figuras A e B, apresentam intensas áreas de hemorragia intra-alveolar e antracose, nos aumentos de 20X e 40X, respectivamente. Na imagem C, há em todo o campo, necrose hemorrágica do parênquima pulmonar (possível causa para este evento seria um tromboembolismo pulmonar), aumento de 20X.

O pulmão foi o órgão com os achados histopatológicos mais diversos. Entre estes, foram observadas hemácias ocupando o espaço intra-alveolar, caracterizando a hemorragia intra-alveolar (Figura 8). Além da própria hemorragia, em alguns casos foram observadas áreas com necrose hemorrágica associada e presença ocasional de células gigantes multinucleadas e megacariócitos.

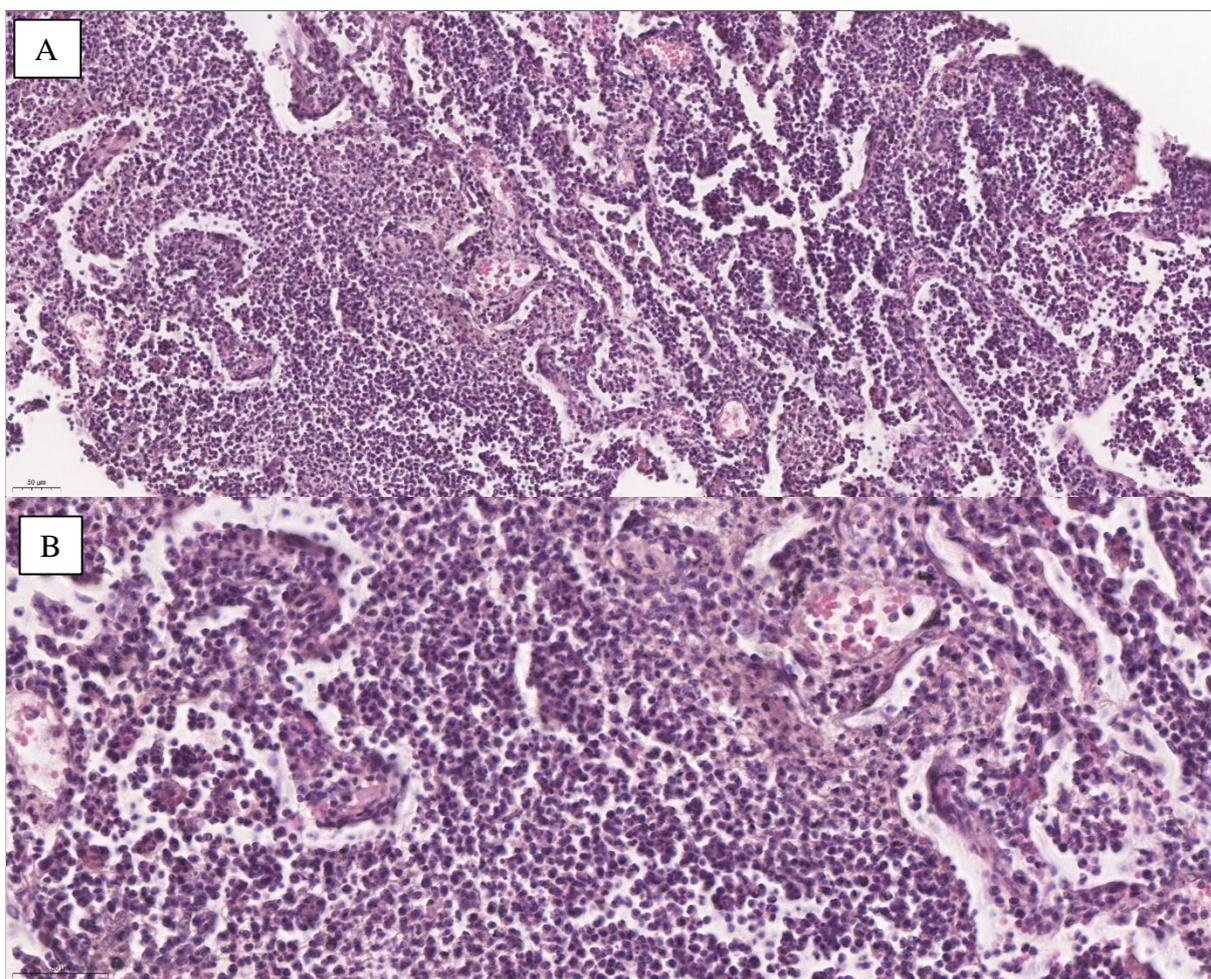
**Figura 8 – Aspectos histopatológicos pulmonares: área de metaplasia escamosa e presença de células gigantes multinucleadas**



**Legenda:** As figuras A e B, mostram áreas sugestivas de metaplasia escamosa dos pneumócitos. Na figura B, ainda, é possível apreciar intensa hemorragia alveolar associada. A figura C, mostra no centro do campo, a presença de uma célula multinucleada em meio a hemorragia ocupando o espaço intra-alveolar. Todas as imagens estão em aumento de 40X.

Por fim, nas amostras pulmonares, foram encontrados quadros de pneumonia, predominantemente broncopneumonia (Figura 9).

**Figura 9 – Aspectos histopatológicos pulmonares: pneumonia**



**Legenda:** As imagens A e B, nos aumentos de 20X e 40X, respectivamente, apresentam acentuado infiltrado inflamatório rico em polimorfonucleares (predominantemente neutrófilos) associado a exsudato purulento, ocupando todo o espaço alveolar e destruindo a parede septal, caracterizando o diagnóstico de broncopneumonia.

A pneumonia foi caracterizada por intenso exsudato fibrino-purulento e acentuado infiltrado inflamatório de polimorfonucleares, predominantemente por neutrófilos, ocupando o espaço alveolar. Com necrose dos septos alveolares, foi possível fazer a diferenciação entre pneumonia lobar e broncopneumonia, mesmo em fragmentos pequenos, como os das amostras pelo método da autópsia minimamente invasiva.

Em seguida, foram analisadas as amostras de coração (Tabela 10).

**Tabela 10 – Tipo, graduação e frequência das lesões cardíacas**

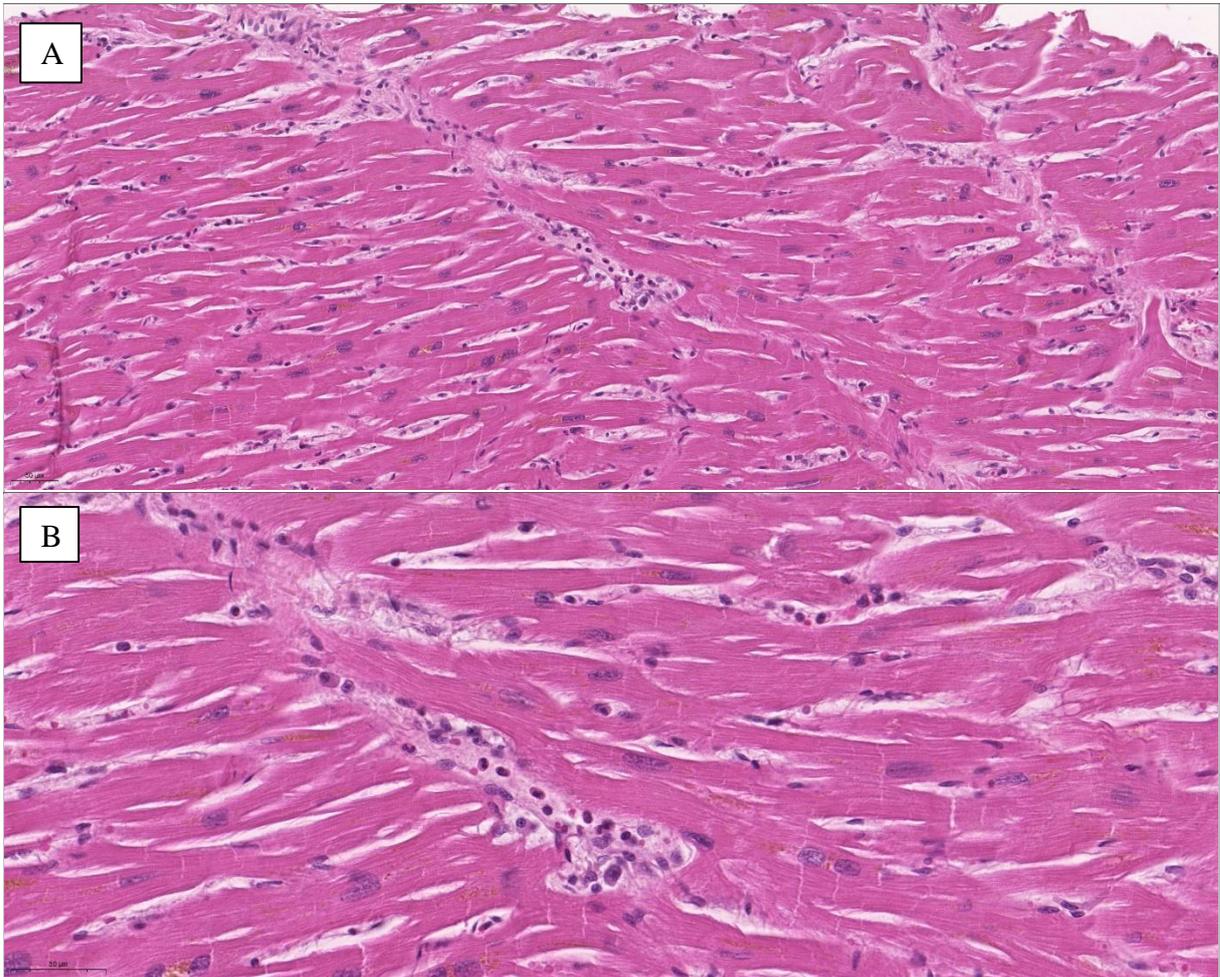
<b>Lesão</b>	<b>Graduação</b>	<b>n</b>	<b>Porcentagem (%)</b>
Miocardite aguda	0	46	100,00
	1	0	0,00
Necrose focal de miócitos	0	40	86,96
	1	6	13,04
	2	2	4,35
Infiltrado Inflamatório miocárdico focal	0	29	63,04
	1	15	32,61
	3	0	0,00
Miocardite borderline	0	46	100,00
	1	0	0,00
Cardiomiopatia Inflamatória	0	45	97,83
	1	1	2,17
Macrófagos intersticiais	0	45	97,83
	1	1	2,17
Alterações isquêmicas	0	45	97,83
	1	1	2,17
Infarto miocárdico	0	32	69,57
	1	14	30,43
Edema intersticial	0	42	91,30
	1	4	8,70
Infiltrado linfocitário epicárdico	0	46	100,00
	1	0	0,00
Trombose arterial microvascular	0	46	100,00
	1	0	0,00
Trombose venosa microvascular	0	46	100,00
	1	0	0,00

**Legenda:** tabela com os tipos de lesões, graduações e suas frequências nas amostras cardíacas. As principais alterações foram focos de infiltrado inflamatório e fibrose entre os miocardiócitos. Sinais de miocardite não foram observados.

**Fonte da tabela:** desenvolvido pelo autor

O exame das amostras de coração evidenciou grande frequência de focos de infiltrado inflamatório misto, constituído por células polimorfo e mononucleares, sem sinais de agressão às fibras cardíacas, em 36,96% dos fragmentos, caracterizando inflamação subaguda com intensidade leve a moderada. Não foram observados sinais de miocardite aguda. Foram também observados sinais de infarto miocárdico antigo e fibrose intersticial em cerca de 30% das amostras. Abaixo, seguem algumas imagens com os achados mais relevantes das amostras cardíacas.

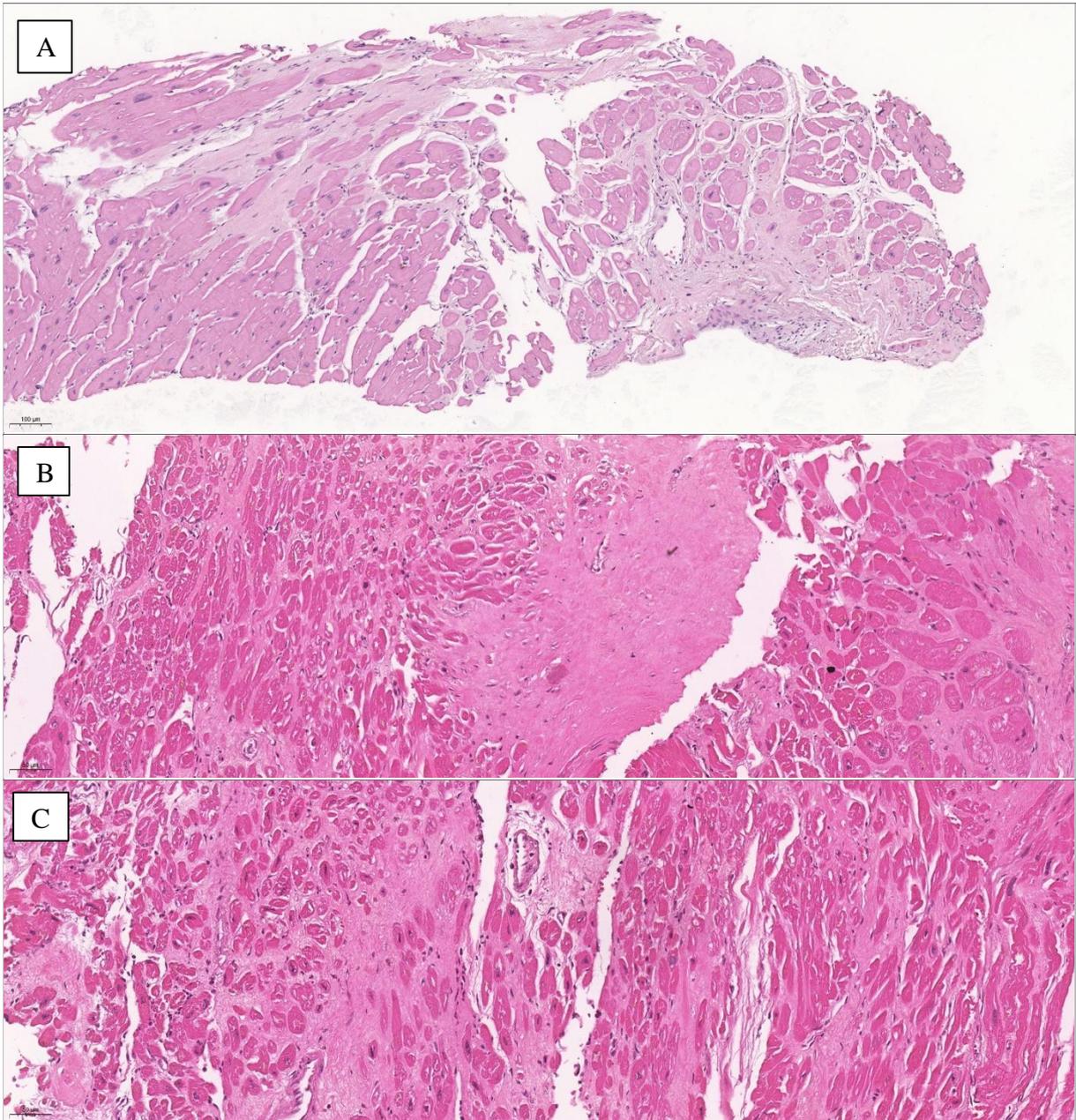
**Figura 10 – Aspectos histopatológicos cardíacos: infiltrado inflamatório**



**Legenda:** As figuras A e B, nos aumentos de 20X e 40X, respectivamente, mostram fragmentos de coração apresentando infiltrado inflamatório, com predomínio de mononucleares e raros neutrófilos. Nota-se ainda, pigmentos de lipofuscina intracitoplasmáticos, principalmente nos cardiomiócitos dos cantos inferior esquerdo e superior direito.

Como pode-se notar na Figura 10, o padrão inflamatório é misto e composto por mononucleares e polimorfonucleares. Outro achado frequente foi a fibrose, com áreas hialinizadas, de aspecto mais antigo.

**Figura 11 – Aspectos histopatológicos cardíacos: fibrose**



**Legenda:** As figuras A, B e C, mostram fragmentos de coração com áreas de depósito de colágeno espesso e organizado (sugestivo de fibrose cicatricial) entre as fibras miocárdicas e as substituindo. Aumentos de 10X, 20X e 20X, respectivamente.

Nestas imagens, pode-se notar extensas áreas de substituição de células musculares cardíacas por áreas de fibrose de padrão cicatricial, com fibras de colágeno densas e organizadas.

Das amostras do fígado, as frequências das lesões são apresentadas na Tabela 11.

**Tabela 11 – Tipo, graduação e frequência das lesões hepáticas**

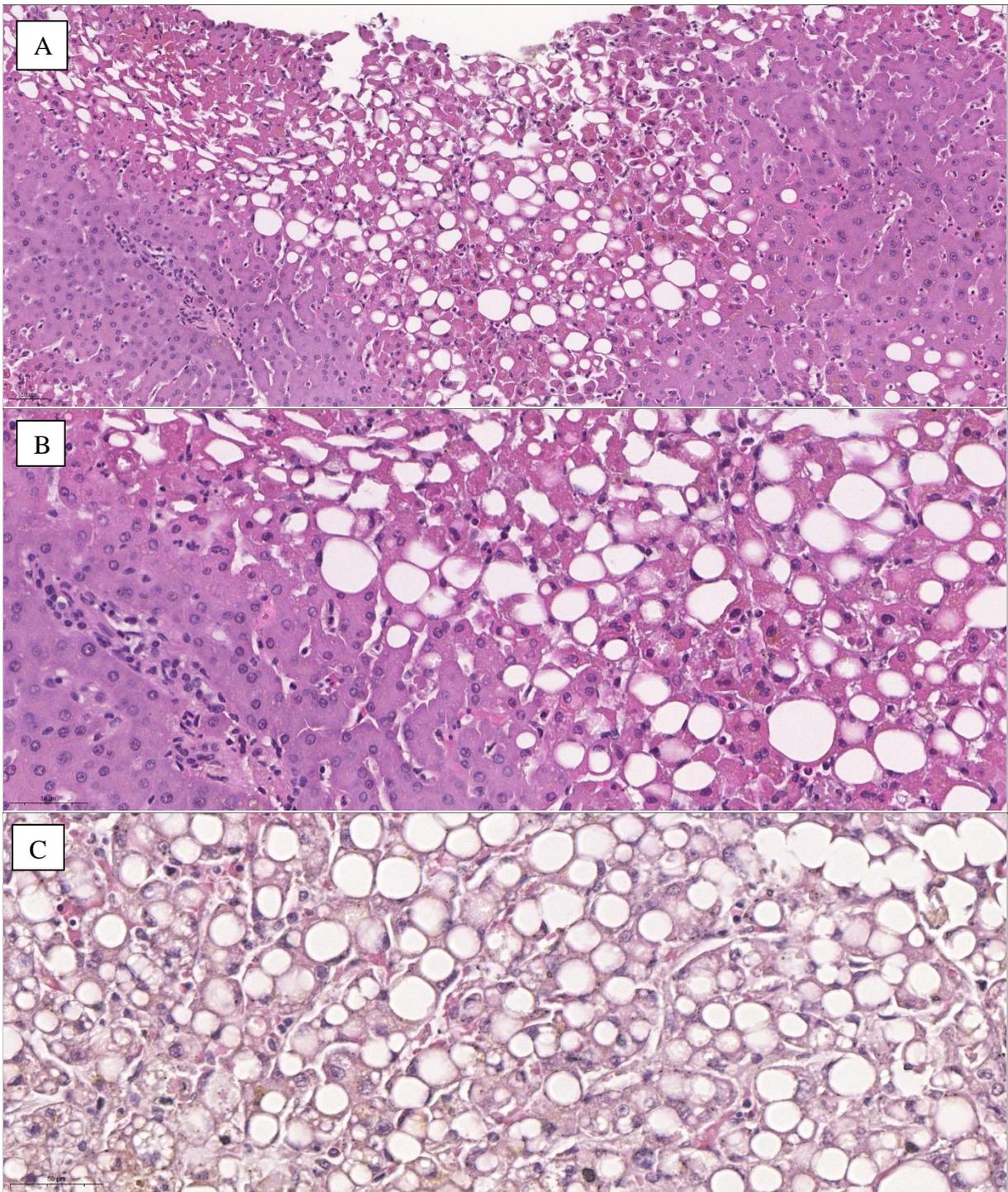
<b>Lesão</b>	<b>Graduação</b>	<b>n</b>	<b>Porcentagem (%)</b>
Congestão centrolobular	0	19	38,00
	1	27	54,00
	2	4	8,00
	3	0	0,00
Fígado do choque	0	38	76,00
	1	12	24,00
Esteatose	0	15	30,00
	1	21	45,00
	2	11	22,00
	3	3	6,00
Necrose e apoptose de hepatócitos	0	44	88,00
	1	4	8,00
	2	2	4,00
	3	0	0,00
Infiltrado linfocitário	0	15	30,00
	1	19	38,00
	2	14	28,00
	3	2	4,00
Colestase	0	32	64,00
	1	11	22,00
	2	6	12,00
	3	1	2,00

**Legenda:** tabela com os tipos de lesões, graduações e suas frequências nas amostras hepáticas. As alterações secundárias, principalmente a eventos do choque, foram as mais frequentes, predominantemente a congestão centrolobular e o fígado do choque. Sinais de doenças secundárias também foram observadas, como esteatose hepática.

**Fonte da tabela:** desenvolvido pelo autor

A principal alteração hepática encontrada foi a esteatose (70%), em diversos graus, sendo que as discretas e moderadas foram as mais frequentes (45% e 22% respectivamente). Alterações circulatorias, de causa secundária, como congestão e o “fígado do choque” também foram observadas. A presença do infiltrado inflamatório, principalmente linfocitário foi examinado em algumas distribuições: a mais típica em localização portal, mas também houve um caso com atividade de interface observada; além disso, em 8 (16%) dos casos, houve atividade lobular desse infiltrado inflamatório. Por fim, a colestase foi um dado encontrado em diversas amostras (36%) e em todos os graus analisados (ausente, discreto, moderado e acentuado). Abaixo, seguem figuras dos aspectos histopatológicos mais encontrados nas amostras hepáticas.

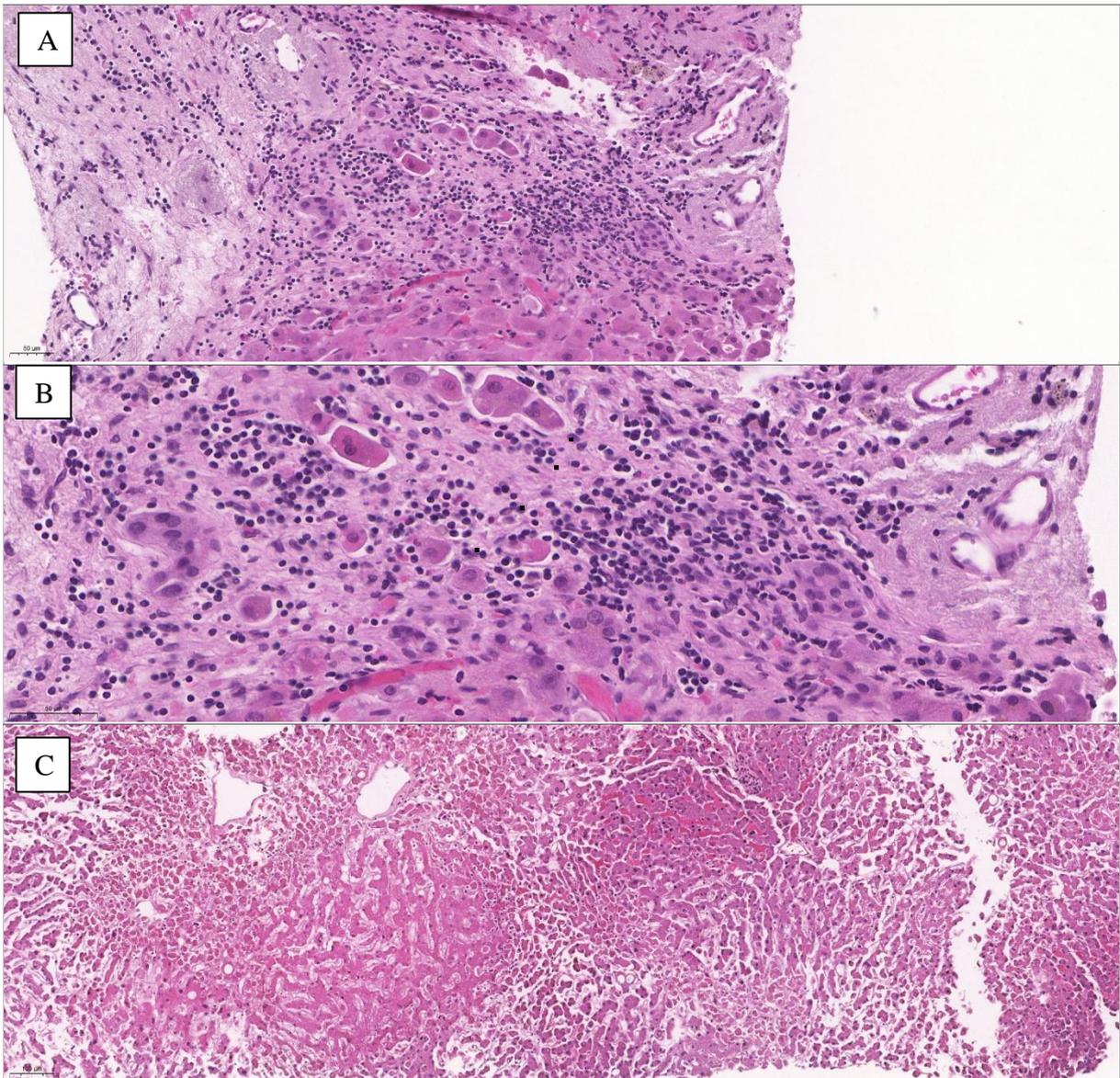
**Figura 12 – Aspectos histopatológicos hepáticos: esteatose**



**Legenda:** As imagens A, B e C mostram parênquima hepático com diversos graus de esteatose. A imagem A, em aumento de 20X e seu detalhe em 40X, na imagem B, mostram fígado com esteatose macrogoticular, além de focos de atividade lobular e raros hepatócitos apoptóticos. A imagem C, exibe acentuada esteatose hepática, além de sinais de colestatose intracitoplasmática e intracanalicular (mais evidente no canto inferior esquerdo da imagem), aumento de 40X.

Outros achados como associação com inflamação, como esteato-hepatite, inflamação portal, com ou sem atividade de interface, colestase e eventos circulatórios também foram observados (Figura 13).

**Figura 13 – Aspectos histopatológicos hepáticos: infiltrado inflamatório e “fígado do choque”**



**Legenda:** A figura A e B, representam a mesma área de infiltrado inflamatório em um trato portal, em aumentos de 20X e 40X, respectivamente. Este é composto predominantemente de células mononucleares, exibindo focos de atividade de interface. Observe o enclausuramento fibroso de alguns hepatócitos periportais. Na imagem C, em aumento de 20X, há intensa área de necrose hemorrágica e congestão, principalmente concentrada na zona 3 de Rappaport, traduzindo o diagnóstico de fígado do choque.

Em 70% das amostras, a presença de infiltrado inflamatório composto por linfócitos, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos, que agrediram os hepatócitos da interface, inclusive levando a apoptose de hepatócitos. Também foi possível observar áreas onde o infiltrado

inflamatório agredia os hepatócitos dentro dos ácinos hepáticos e acúmulos de pigmentos de colestase intracitoplasmáticos, intracanaliculares e, raramente, intraductulares.

Das amostras esplênicas, as frequências das lesões são apresentadas na tabela abaixo. Após elas, é possível apreciar algumas imagens das lesões mais características, acompanhadas das suas descrições histopatológicas.

**Tabela 12 – Tipo, graduação e frequência das lesões esplênicas**

<b>Lesão</b>	<b>Graduação</b>	<b>n</b>	<b>Porcentagem (%)</b>
Hemorragia e Congestão	0	1	2,78
	1	24	66,67
	2	11	30,56
	3	0	0,00
Hematofagocitose	0	21	58,33
	1	13	36,11
	2	2	5,56
	3	0	0,00
Trombose arterial e vasculite	0	36	100,00
	1	0	0,00
Hemorragia da polpa vermelha	0	15	41,67
	1	21	58,33
Granuloma necrotizante	0	36	100,00
	1	0	0,00
Depleção linfocitária	0	15	41,67
	1	19	52,78
	2	2	5,56
	3	0	0,00
Atrofia da polpa branca	0	31	86,11
	1	5	13,89
Necrose do parênquima	0	34	94,44
	1	2	5,56
Esplenite aguda	0	36	100,00
	1	0	0,00

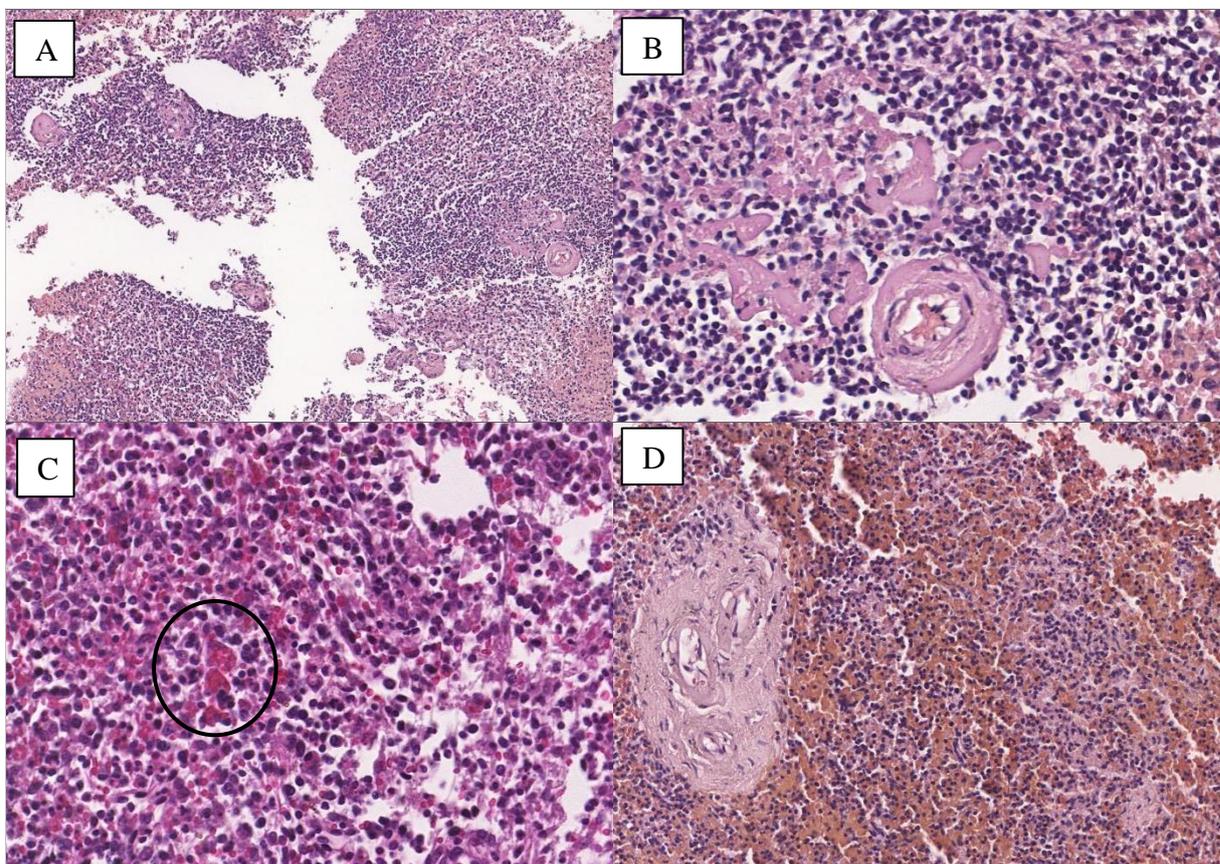
**Legenda:** tabela com os tipos de lesões, graduações e suas frequências nas amostras esplênicas. Os sinais de depleção da polpa branca e áreas de hemorragia da polpa vermelha foram os achados mais frequentes. Presença de figuras de hematofagocitose foram visualizadas.

**Fonte da tabela:** desenvolvido pelo autor

As alterações esplênicas encontradas estavam associadas, principalmente, à distribuição e quantidade da polpa branca, com linfocitopenia, nas formas de depleção linfocitária e atrofia da polpa branca, somados acometendo mais de 70% dos casos examinados. De forma concomitante, em mais da metade dos casos, houve substituição desse parênquima pela polpa vermelha com áreas de hemorragia. As figuras de hematofagocitose foram encontradas em graduações variadas, mas em quantidade expressiva de casos (totalizando 41,67%). Dois casos

mostraram necrose focal ou ampla do parênquima, sem outros critérios adicionais. Por fim, abaixo seguem as imagens, conforme comentado anteriormente.

**Figura 14 – Aspectos histopatológicos esplênicos: atrofia da polpa branca, hemorragia intraparenquimatosa e hematofagocitose**



**Legenda:** A figura A revela parênquima esplênico em vista panorâmica, com aumento de 10X. A figura B, mostra a atrofia da polpa branca, além de hialinização dos cordões de Billroth, aumento de 40X. A figura C apresenta focos de figuras de hematofagocitose, como evidenciado dentro da área circulada, em detalhe de 40X. Em D, observa-se extensa área de hemorragia do parênquima e expansão da polpa vermelha, aumento de 20X.

O parênquima esplênico apresentou alterações da polpa branca, da polpa vermelha e alguns achados intraparenquimatosos.

Por fim, das amostras dos rins, a tabela abaixo mostra as principais lesões e suas frequências relativas. Em sequência, serão apresentadas fotomicrografias das lesões típicas encontradas, bem como uma breve descrição morfológica.

**Tabela 13 – Tipo, graduação e frequência das lesões renais**

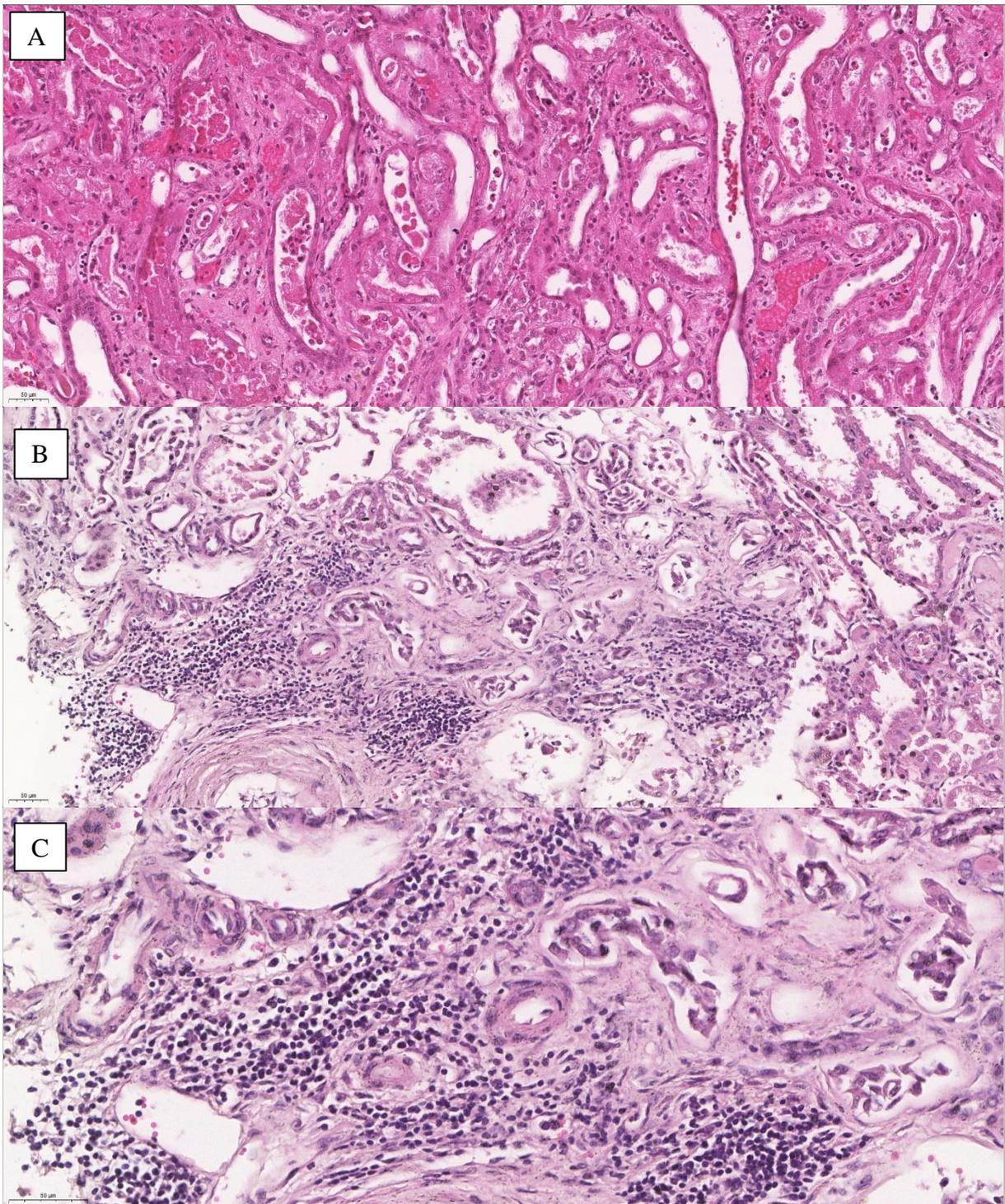
<b>Lesão</b>	<b>Graduação</b>	<b>n</b>	<b>Porcentagem (%)</b>
Necrose Tubular Aguda (NTA)	0	0	0,00
	1	33	78,57
	2	9	21,43
	3	0	0,00
Nefrite Túbulo-Intersticial Aguda	0	33	78,6
	1	9	21,4
Lesão endotelial e microtrombos (TMA)	0	35	83,33
	1	7	16,67
Necrose Cortical	0	41	97,62
	1	1	2,38
Infarto	0	41	97,62
	1	1	2,38
Rabdomiólise e acúmulos de pigmentos tubulares	0	32	76,19
	1	10	23,81
Glomerulopatia Colapsante	0	39	92,86
	1	3	7,14
Glomerulonefrites	0	30	71,43
	1	12	28,57
Pielonefrite Aguda	0	37	88,10
	1	5	11,90

**Legenda:** tabela com os tipos de lesões, graduações e suas frequências nas amostras renais. A necrose tubular aguda foi o achado mais frequente, seguido de nefrite intersticial e alterações glomerulares.

**Fonte da tabela:** desenvolvido pelo autor

A alteração morfológica mais frequente foi a necrose tubular aguda, encontrada em todos os casos, em diversos graus de intensidade. Em seguida, a nefrite túbulo-intersticial foi observada em cerca de 21% das amostras. Alterações glomerulares como glomerulonefrites, incluindo a glomeruloesclerose segmentar e focal, esclerosante global e glomerulopatia colapsante, também foram observadas em alguns casos. Necrose cortical e alterações isquêmicas/infarto foram observadas em apenas um caso, cada. Acúmulos de pigmentos intratubulares, podendo ou não estar relacionados à rabdomiólise foram observados pouco menos de 1/4 dos casos. As figuras abaixo exemplificam as lesões mais relevantes e típicas, encontradas nas amostras examinadas.

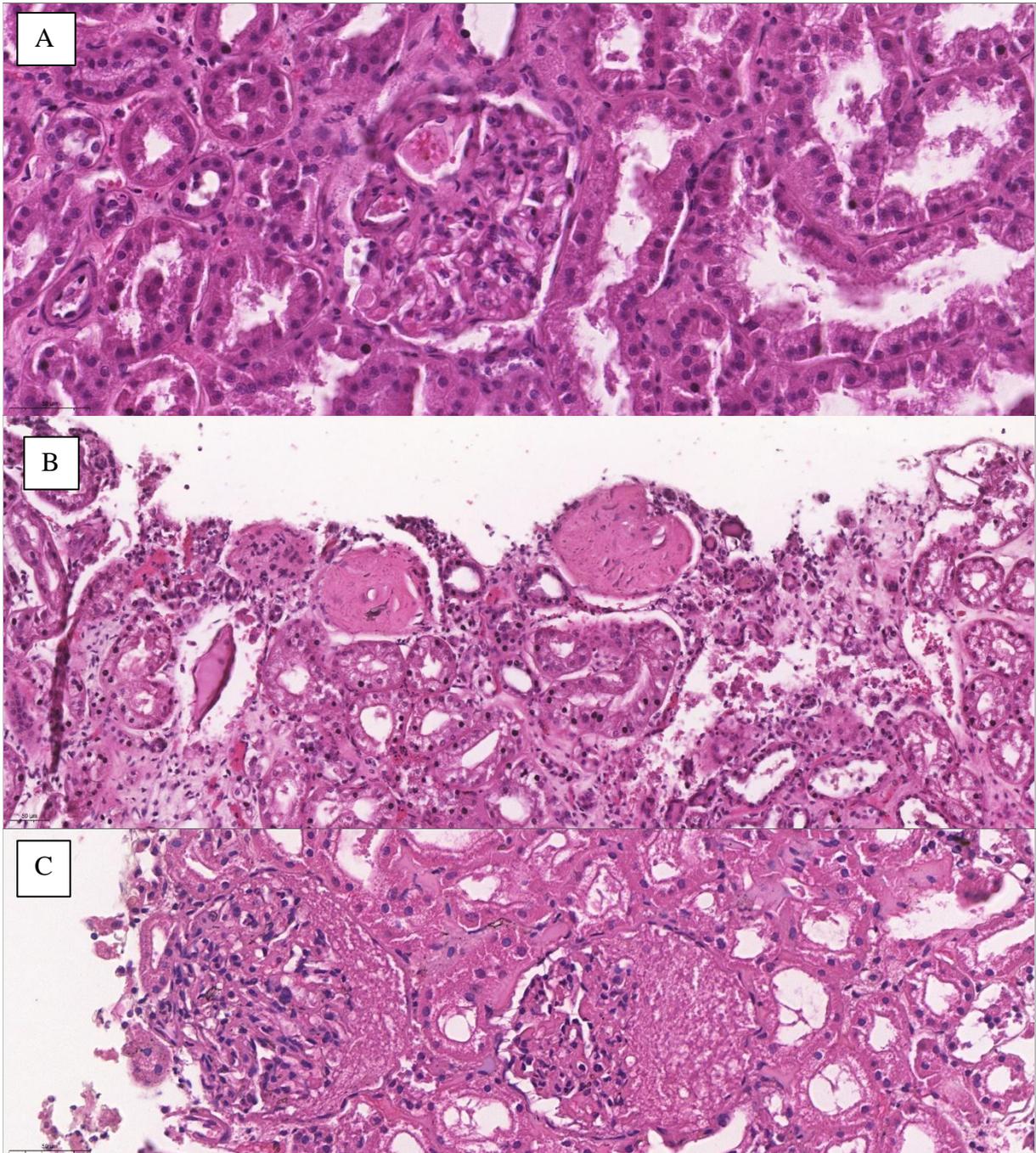
**Figura 15 – Aspectos histopatológico renais: NTA e nefrite túbulo-intersticial**



**Legenda:** A figura A, mostra alterações compatíveis com necrose tubular aguda (NTA), em aumento de 20X. Nesta, há descamação das células tubulares, que ocupam o lúmen, com restos celulares, nucleados e não nucleados. As imagens B e C, em aumento de 20X e de 40X, respectivamente, mostram o achado de nefrite túbulo-intersticial, em que um moderado infiltrado inflamatório rico em linfócitos ocupa e expande o parênquima renal. Ainda, há focos de fibrose intersticial e focos de atrofia de alguns túbulos renais.

As áreas de necrose tubular aguda foram as mais encontradas em, virtualmente todas as amostras de parênquima renal. A necrose tubular aguda foi caracterizada pela presença de áreas de descamação das células do epitélio tubular e a presença destas nucleadas ou anucleadas, dentro desse lúmen. Associado a isso, a presença de cristais granulares, favoreciam ainda mais esse diagnóstico. Um achado histopatológico que traduz o padrão de resposta inflamatória nas amostras renais foi a presença de infiltrado inflamatório, predominantemente, ocupando o interstício do órgão. Dessa forma, o diagnóstico de nefrite túbulo-intersticial foi bem documentado, sendo caracterizado por áreas de infiltrado inflamatório, predominantemente mononuclear, mas outras células inflamatórias compunham esse agregado celular, ocupando e alargando o interstício renal. Áreas de fibrose intersticial e de atrofia tubular, devido a agressão inflamatória, também foram apreciados. Além do componente inflamatório, outros achados, como glomerulopatias também foram encontrados, conforme apresentados nas imagens abaixo.

**Figura 16 – Aspectos histopatológico renais: microangiopatia trombótica, glomeruloesclerose e glomerulopatia colapsante**



**Legenda:** A figura A, em aumento de 40X, mostra foco de microangiopatia trombótica em alças do glomérulo evidenciado. Figura B, em aumento de 20x mostra, glomérulos totalmente esclerosados. Em detalhe, na imagem C, em aumento de 40X, dois glomérulos apresentando achado sugestivo de glomerulopatia esclerosante segmentar e focal, ou menos provavelmente, glomerulopatia crescêntica.

A microangiopatia trombótica foi observada, quando as lesões eram caracterizadas por microtrombos, fragmentos de hemácias ou até zonas de fibrose na intimidade do endotélio glomerular, como mostrado na figura acima. Outras formas de glomerulopatia, como

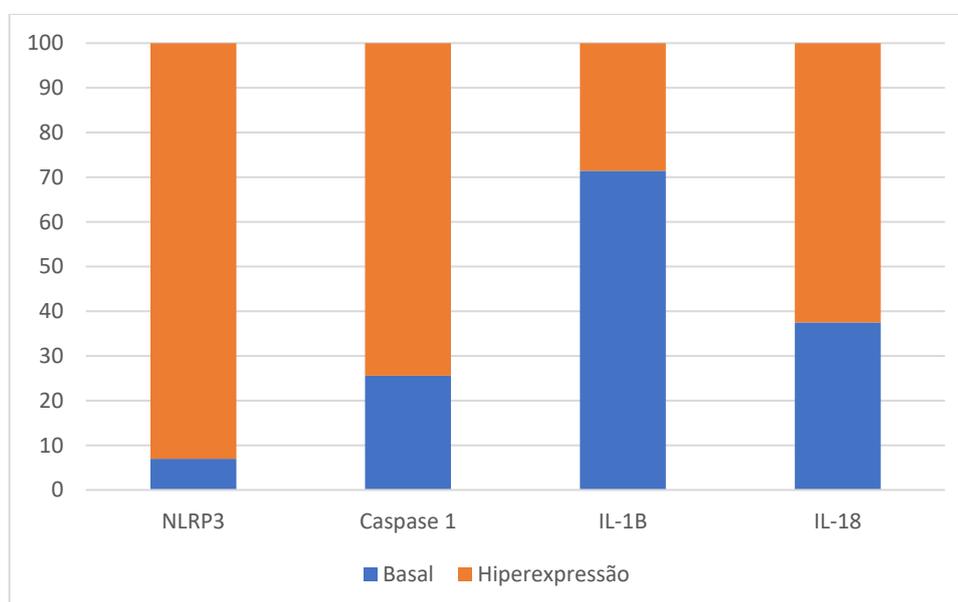
glomerulopatia esclerosante segmentar e focal, ou até mesmo a global puderam ser observadas. Na imagem acima, pode-se apreciar uma amostra de rim onde todos os glomérulos apresentavam esclerose global, provavelmente levando a um quadro de insuficiência renal para o paciente. Outra forma de alteração glomerular, não tão frequente como a comentada anteriormente, foi a glomerulopatia colapsante, onde pôde-se observar pelo menos um tufo glomerular colapsado, com obliteração de parte ou do todo das alças capilares e discreta hipertrofia dos podócitos adjacentes.

Após a análise dos principais aspectos histopatológicos de cada topografia, suas frequências a apresentando a morfologia por meio de imagens, pode-se individualizar a principal característica relacionada a um processo infeccioso/inflamatório: DAD; miocardite; hepatite; e nefrite. O pulmão e o fígado foram os órgãos que apresentaram maiores proporções desse acometimento inflamatório, sendo 64.4% e 71.4%, respectivamente. O coração e os rins, apresentaram menos da metade de casos com inflamação desses órgãos, sendo 36.2% e 21.4%, respectivamente. Então, considerando-se a ocorrência de resposta inflamatória simultânea em três ou mais dos órgãos estudados no momento do óbito, independentemente da etiologia do processo inflamatório, foi possível observar um fenótipo inflamatório sistêmico em 35 casos (70%) da população incluída no estudo. Complementarmente, em 15 casos (30%) a resposta inflamatória não foi observada ou foi apenas localizada.

### 5.3 EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO INFLAMASSOMA NLRP3

Para avaliação da imunorreatividade dos integrantes do inflamassoma NLRP3 no pulmão, coração, fígado, baço e rim, por meio da técnica de imuno-histoquímica, foram realizados ensaios com os anticorpos primários anti-NLRP3, anti-Caspase-1, anti-IL1 $\beta$  e anti-IL-18. O Gráfico 9 apresenta a expressão imuno-histoquímica de NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 nas amostras de pulmão

**Gráfico 9 – Gráfico de barras da expressão imuno-histoquímica de NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 nas amostras de pulmão**

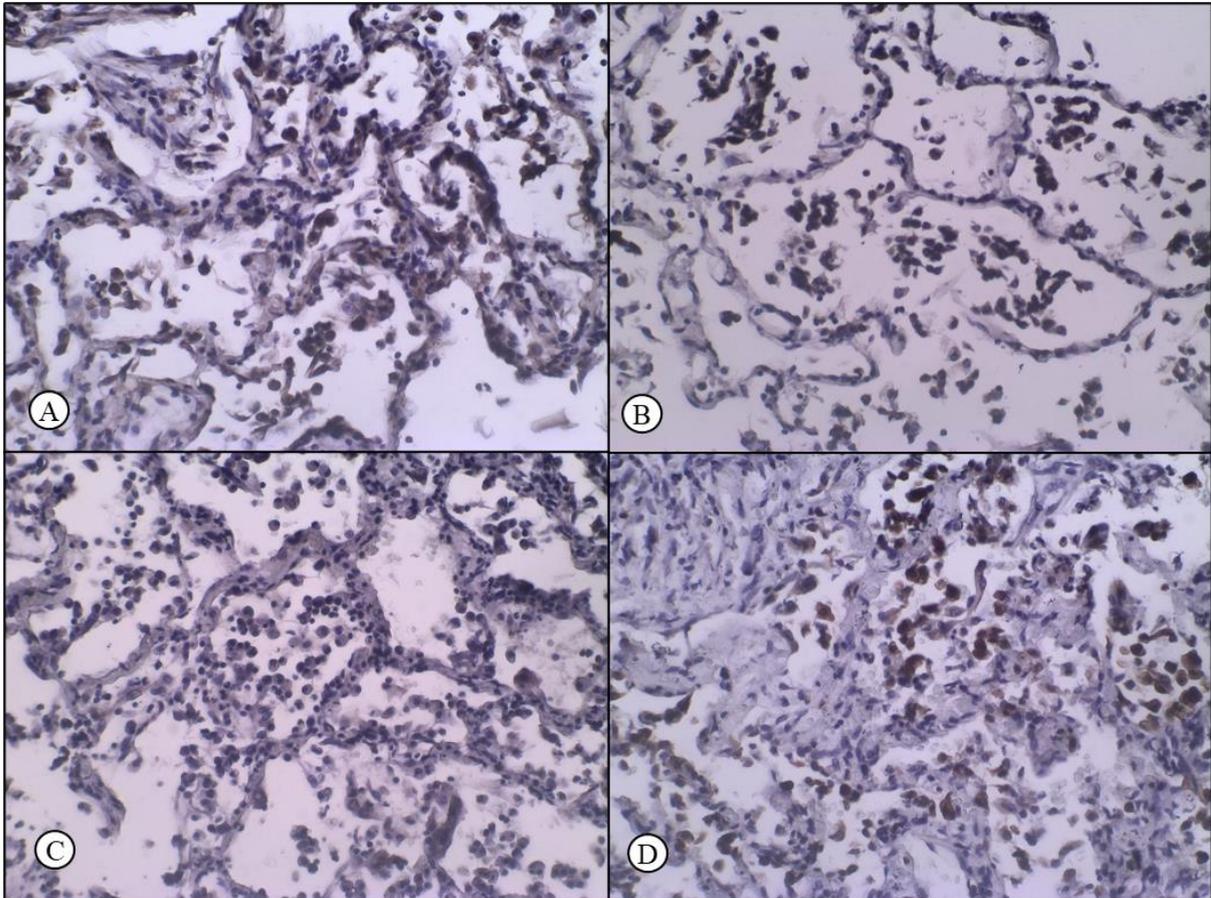


**Legenda:** a expressão imuno-histoquímica do inflamassoma NLRP3 e seus produtos nas amostras pulmonares. Há hiperexpressão em mais de dois terços dos casos em se tratando do próprio inflamassoma e de dois dos seus subprodutos: a Caspase-1 e a IL-18. A IL-1 $\beta$  foi hiperexpressa em menos da metade dos pacientes, não sendo, necessariamente, ativada pelo inflamassoma nessas análises.

**Fonte:** desenvolvido pelo autor

Em se tratando da avaliação pulmonar, foi observada hiperexpressão de NLRP3 em 93,02% dos casos, de Caspase-1 em 74,42% e de IL-18 em 62,50%. A IL-1 $\beta$  manteve expressão basal na maioria dos casos, com hiperexpressão em apenas 28,57%. A Figura 17 ilustra os resultados da imuno-histoquímica dos integrantes do inflamassoma NLRP3 no pulmão.

**Figura 17 – Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 nas amostras de pulmão**

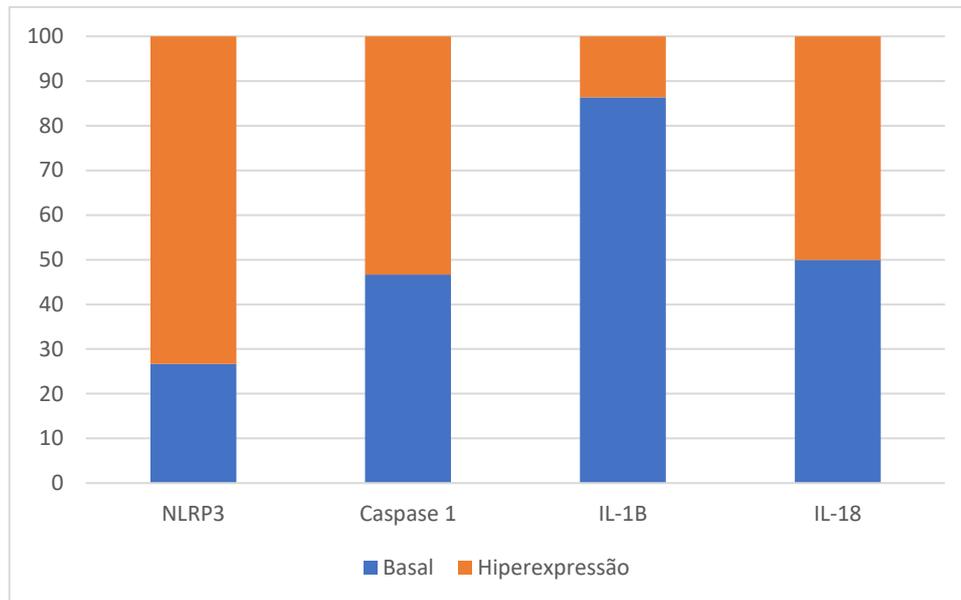


**Legenda:** A e D. Hiperexpressão de NLRP3 e IL-18 nos macrófagos alveolares e pneumócitos (Ampliação de 400 $\times$ ). B e C. Expressão moderada de Caspase-1 e IL-1beta predominantemente nos macrófagos alveolares (Ampliação de 400 $\times$ ).

As fotomicrografias demonstram que, exceto para IL-1beta, os demais integrantes do inflamassoma NLRP3 exibiram predominante hiperexpressão nos macrófagos alveolares e nos pneumócitos. A expressão dessas moléculas em outras células do tecido pulmonar, como células endoteliais, e outras inflamatórias, como linfócitos, foi predominantemente basal.

A seguir, o gráfico abaixo apresenta a frequência e as graduações dos imunomarcadores de fragmentos cardíacos.

**Gráfico 10 – Gráfico de barras da expressão imuno-histoquímica de NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 nas amostras de coração**

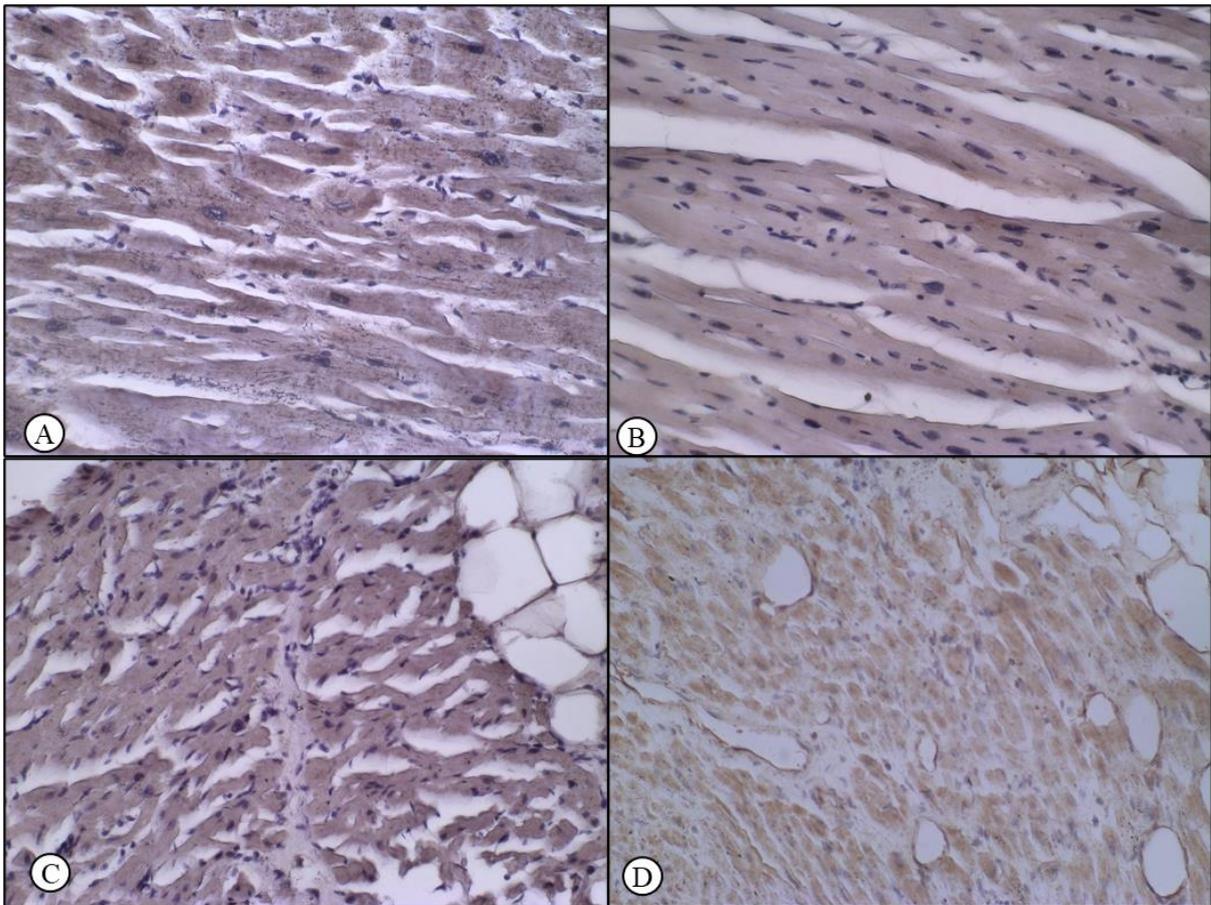


**Legenda:** a expressão imuno-histoquímica do inflamassoma NLRP3 e seus produtos nas amostras cardíacas. Há hiperexpressão do próprio inflamassoma e de dois dos seus subprodutos: a Caspase-1 e a IL-18. A IL-1 $\beta$  foi hiperexpressa na minoria dos casos, não sendo necessariamente ativada pelo inflamassoma nessas análises.

**Fonte:** desenvolvido pelo autor

De forma semelhante ao apresentado no gráfico dos fragmentos pulmonares, também foi observada hiperexpressão de NLRP3 em 73,33%, de Caspase-1 em 53,33% e de IL-18 em 50,00%. Apenas a IL-1 $\beta$  apresentou hiperexpressão em uma minoria dos casos (13,64%) do material amostrado. A Figura 18 ilustra os resultados da imuno-histoquímica dos integrantes do inflamassoma NLRP3 no coração.

**Figura 18 – Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 nas amostras de coração**

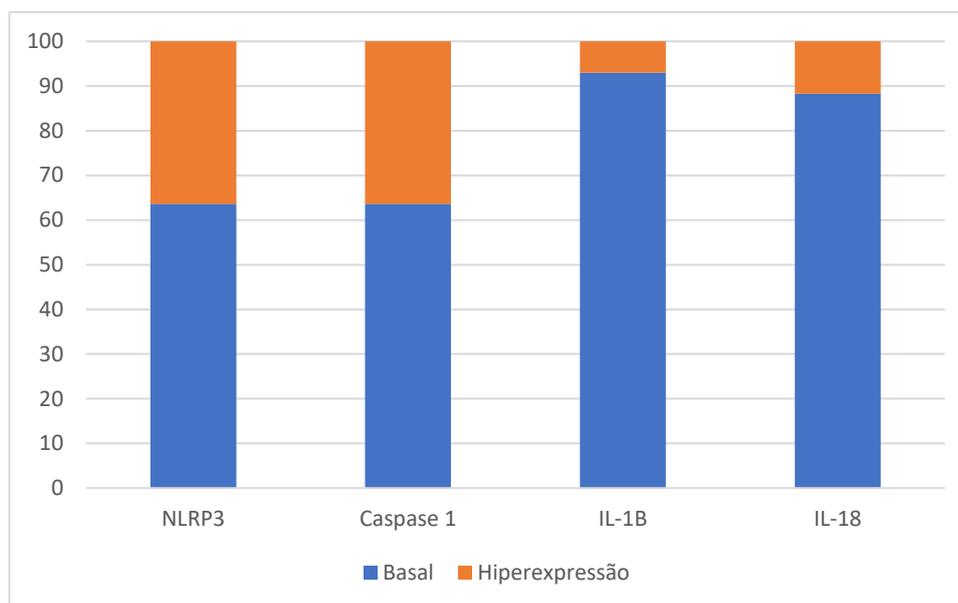


**Legenda:** A e C. Hiperexpressão difusa de NLRP3 e IL-1beta nos cardiomiócitos. Há depósitos de pequenos pigmentos no citoplasma de algumas células (Ampliação de 400 $\times$ ). B e D. Expressão difusa e moderada de Caspase-1 e IL-18 nos cardiomiócitos (Ampliação de 400 $\times$ ).

As fotomicrografias demonstram o predomínio da expressão difusa e com intensidade moderada de todos os integrantes do inflamassoma NLRP3 no coração. A expressão citoplasmática destas moléculas foi homogênea e, exceto pela forte marcação das células endoteliais com IL-18, praticamente restrita aos cardiomiócitos.

A seguir, o gráfico abaixo apresenta a frequência e as graduações do painel imuno-histoquímico realizado nos fragmentos hepáticos.

**Gráfico 11 – Gráfico de barras da expressão imuno-histoquímica de NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 nas amostras de fígado**

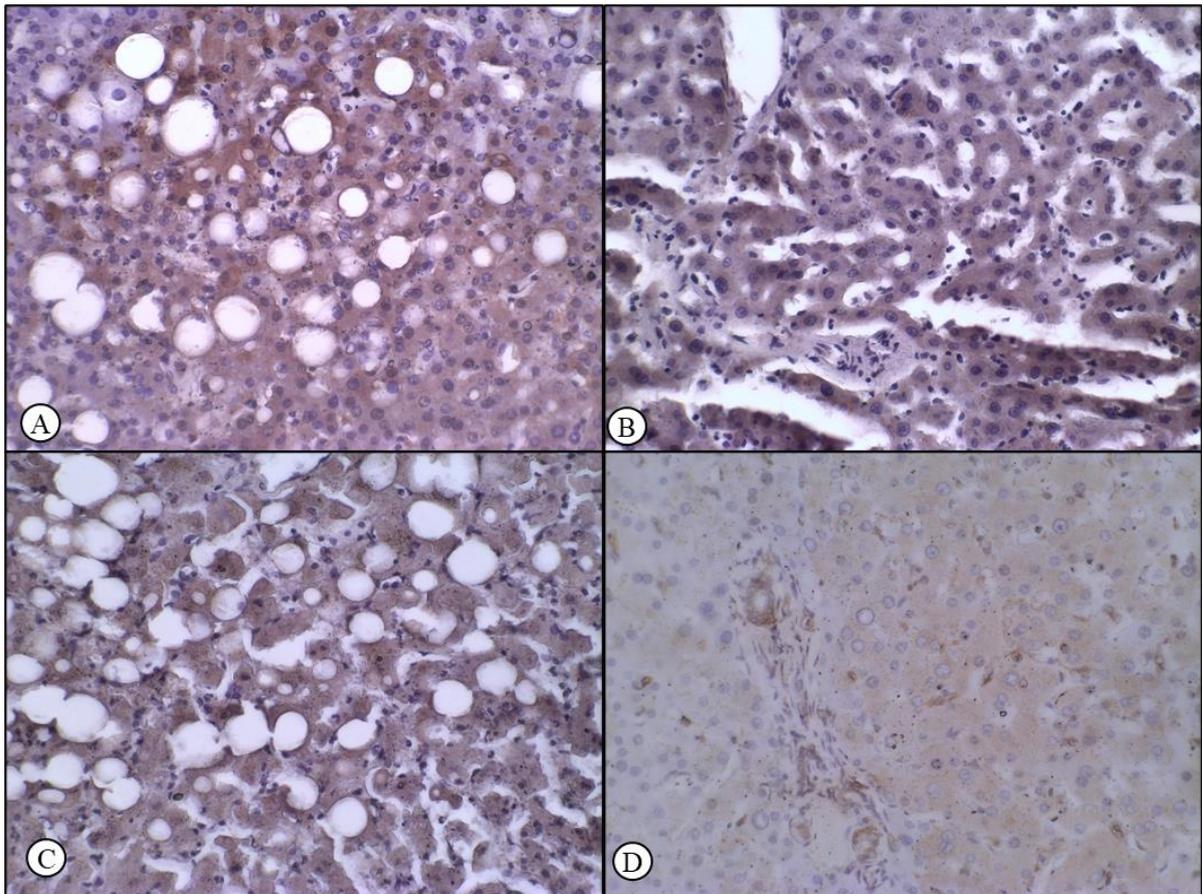


**Legenda:** A expressão imuno-histoquímica do inflamassoma NLRP3 e seus produtos nas amostras hepáticas. A hiperexpressão foi examinada em menos da metade dos casos, principalmente da NLRP3 e da Caspase-1. As interleucinas 1 $\beta$  e 18 praticamente não apresentaram hiperexpressão.

**Fonte:** desenvolvido pelo autor

O fígado, diferente do que foi visualizado no pulmão e coração, apresentou menor expressão geral do inflamassoma e de seus produtos. A hiperexpressão de NLRP3 foi observada em 36,36% dos casos, da Caspase-1 em 36,36%, da IL-1 $\beta$  em 6,98% e da IL-18 em 11,76% dos casos. No fígado, a proporção de expressão basal da IL-1 $\beta$  foi maior do que nos pulmões e coração. A Figura 19 ilustra os resultados da imuno-histoquímica dos integrantes do inflamassoma NLRP3 no fígado.

**Figura 19 – Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 nas amostras de fígado**

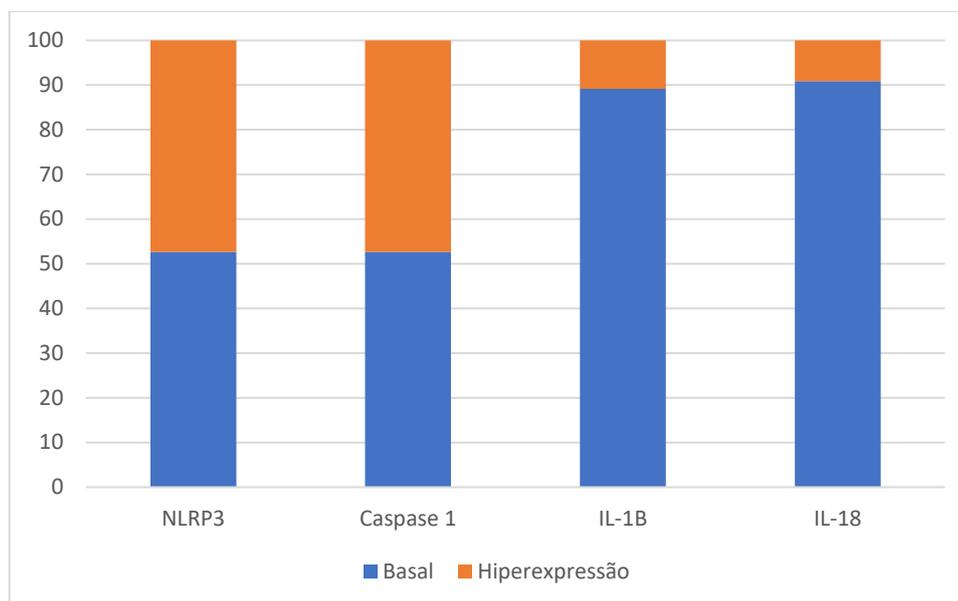


**Legenda:** A, B e C. Hiperexpressão difusa de NLRP3, Caspase-1 e IL-1 $\beta$  nos hepatócitos. Há focos de esteatose micro e macrovacuolar em A e C (Ampliação de 400 $\times$ ). D. Expressão difusa e moderada de IL-18 nos hepatócitos. Notar a presença de intensa reatividade nos macrófagos sinusoidais e epitélio dos ductos biliares (Ampliação de 400 $\times$ ).

No caso dos integrantes NLRP3, Caspase 1 e IL-1 $\beta$  da plataforma do inflamassoma NLRP3, as fotomicrografias selecionadas demonstram aquelas amostras minoritárias que apresentaram expressão imuno-histoquímica difusa e com forte intensidade destes marcadores. A expressão difusa e moderada da IL-18 nos hepatócitos, predominante nas amostras, contrastou com a forte intensidade da reatividade que foi observada nas células de Kupffer e nos colangiócitos.

Abaixo, é mostrado o gráfico que apresenta a frequência e as graduações do painel imuno-histoquímico realizado nos fragmentos esplênicos.

**Gráfico 12 – Gráfico de barras da expressão imuno-histoquímica de NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 nas amostras de baço**

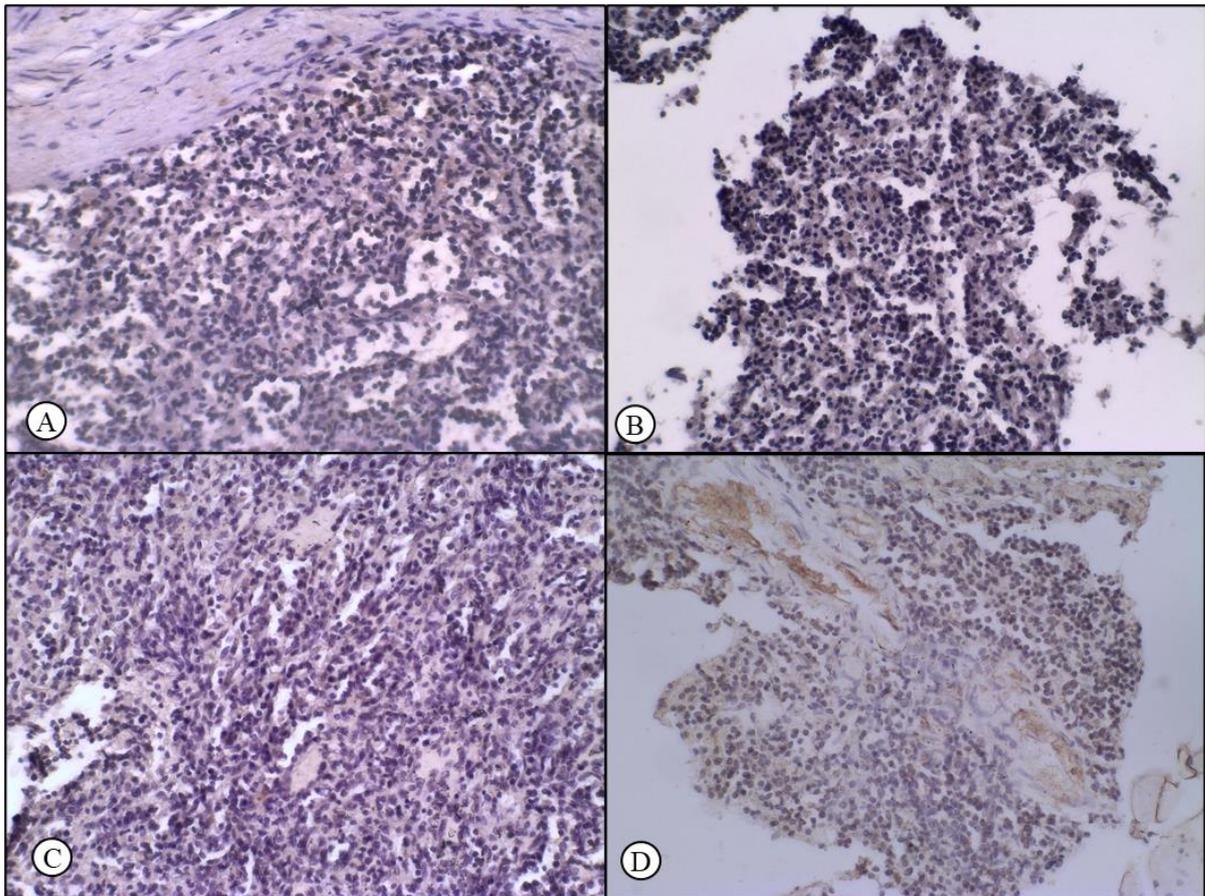


**Legenda:** a expressão imuno-histoquímica do inflamassoma NLRP3 e seus produtos nas amostras esplênicas. A hiperexpressão foi examinada em quase metade dos casos, principalmente da NLRP3 e da Caspase-1. As interleucinas 1 $\beta$  e 18 praticamente não apresentaram hiperexpressão.

**Fonte:** desenvolvido pelo autor

O baço teve resultado da expressão imuno-histoquímica do inflamassoma NLRP3 parecido com o fígado. No baço, também predominaram as marcações basais. As proporções de ativação exacerbada foram de 47,37% para o NLRP3, de 47,37% para a Caspase-1, de 10,81% para a IL-1 $\beta$  e de apenas 9,09% para a IL-18. A Figura 20 ilustra os resultados da imuno-histoquímica dos integrantes do inflamassoma NLRP3 no baço.

**Figura 20 – Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 nas amostras de baço**

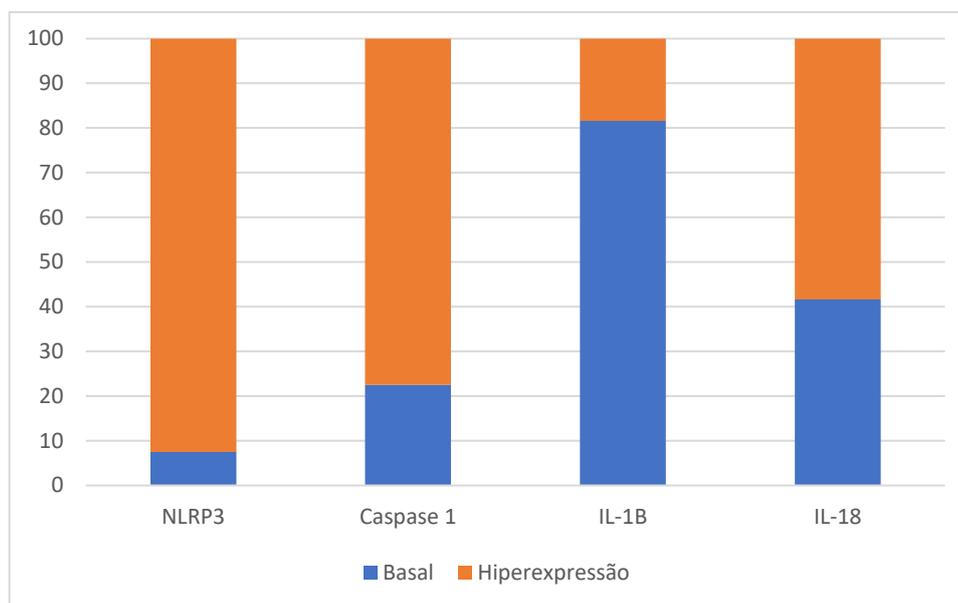


**Legenda:** A, B, C e D. Expressão difusa e moderada de NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 em células endoteliais e macrófagos dos cordões esplênicos, respectivamente. Notar a presença de intensa reatividade de IL-18 nas células endoteliais de vasos trabeculares (Ampliação de 400 $\times$ ).

A expressão imuno-histoquímica de todos os integrantes do inflamassoma NLRP3 nas amostras de baço apresentou predomínio de intensidade leve ou moderada, mas difusamente distribuída nos macrófagos e células endoteliais dos cordões esplênicos. Demais células do baço, com exceção da expressão da IL-18 nas células endoteliais de vasos das trabéculas conjuntivas, apresentaram expressão com intensidade fraca.

Por fim, segue abaixo o Gráfico 13, que apresenta a frequência e as graduações do painel imuno-histoquímico realizado nos fragmentos renais.

**Gráfico 13 – Gráfico de barras da expressão imuno-histoquímica de NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 nas amostras de rim**

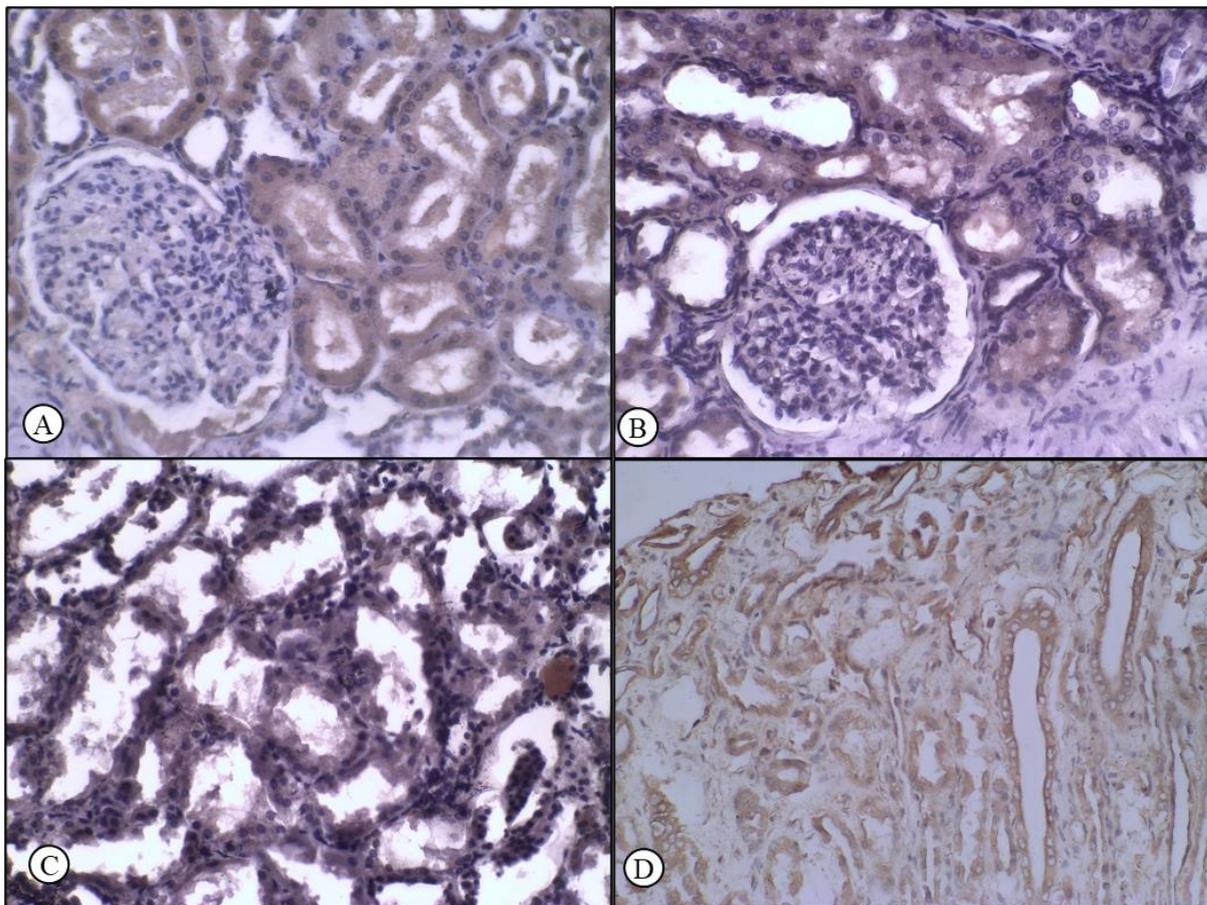


**Legenda:** a expressão imuno-histoquímica do inflamassoma NLRP3 e seus produtos nas amostras renais. Há hiperexpressão do próprio inflamassoma e de dois dos seus subprodutos: a Caspase-1 e a IL-18. A IL-1 $\beta$  foi hiperexpressa na minoria dos casos, não sendo necessariamente ativada pelo inflamassoma nessas análises.

**Fonte:** desenvolvido pelo autor

Os fragmentos renais, análogos ao apresentando no pulmão e coração, mostram maiores proporções de amostras com hiperexpressão imuno-histoquímica do inflamassoma. Nos rins, foram observados os seguintes percentuais de hiperexpressão por integrante molecular: NLRP3 em 92,50% das amostras; Caspase-1 em 77,50% das amostras; e IL-18 em 58,33%. Novamente, apenas a IL-1 $\beta$  apresentou pequena proporção de hiperexpressão (18,42%) nas amostras examinadas. A Figura 21 ilustra os resultados da imuno-histoquímica dos integrantes do inflamassoma NLRP3 no rim.

**Figura 21 – Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 nas amostras de rim**



**Legenda:** A, B, C e D. Hiperexpressão difusa de NLRP3, Caspase-1, IL-1beta e IL-18 em células tubulares renais, respectivamente. Notar a reatividade basal de NLRP3 e Caspase-1 nos glomérulos (Ampliação de 400 $\times$ ).

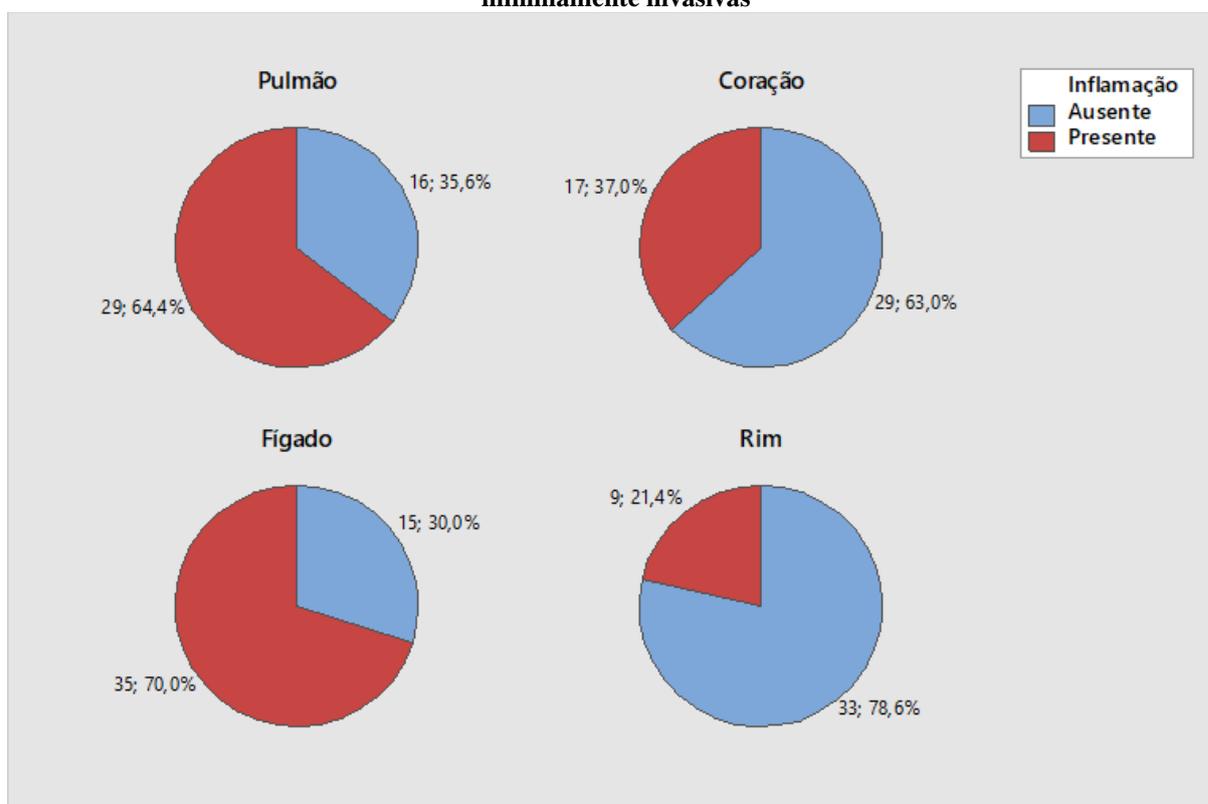
As expressões imuno-histoquímicas dos integrantes NLRP3, Caspase-1 e IL-18 da plataforma do inflamassoma NLRP3 nos túbulos renais foram predominantemente fortes e difusas. A expressão de IL-1beta nos túbulos renais foram predominantemente basais. Entretanto, um pequeno percentual de 18,42% apresentou forte intensidade. Demais estruturas do parênquima, como os glomérulos, e interstício renal apresentaram intensidade fraca na reatividade imuno-histoquímica de todos os alvos moleculares.

Em síntese, pode-se observar predominância de hiperexpressão dos integrantes NLRP3, Caspase-1 e IL-18 do inflamassoma NLRP3 nos pulmões, coração e rins.

## 5.4 ASSOCIAÇÕES ESTATÍSTICAS

Nesta etapa do trabalho serão analisadas as associações entre os achados histopatológicos e imuno-histoquímicos. A Figura 22 representa as principais lesões histopatológicas de natureza inflamatória que foram observadas no pulmão, coração, fígado e rim.

**Figura 22 – Gráficos de setores das principais lesões histopatológicas observadas nas autópsias minimamente invasivas**



**Legenda:** os gráficos de cada topografia exibem a porcentagem de lesões que traduzem um perfil fenotípico inflamatório. Sendo assim, este perfil esteve presente na maioria das amostras de pulmão, coração e fígado, compondo apenas a minoria dos casos das amostras renais. Nos casos em que ao menos três topografias apresentem fenotipo inflamatório, a maioria dos casos, independente dos casos sem inflamação renal, ainda corroborariam este padrão fenotípico. Ao lado de cada parte de setor estão indicados o *n* amostral e o seu respectivo percentual. DAD: Dano alveolar difuso.

**Fonte:** desenvolvido pelo autor

Assim, foram realizados testes estatísticos para avaliar a existência de associações entre os parâmetros da expressão imuno-histoquímica dos marcadores NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 nas amostras de pulmão, com as lesões histopatológicas inflamatórias indicadas na Figura 22.

A Tabela 14 apresenta as proporções de expressão imuno-histoquímica de cada integrante do inflamassoma NLRP3 avaliado por lesão histopatológica inflamatória no pulmão, coração, fígado e rim.

**Tabela 14 – Escores da expressão imuno-histoquímica do inflamassoma NLRP3 no pulmão, coração, fígado e rim**

Inflamação / Imuno- histoquímica		NLRP3		Caspase-1		IL-1 $\beta$		IL18	
		Basal (%)	Hiper (%)	Basal (%)	Hiper (%)	Basal (%)	Hiper (%)	Basal (%)	Hiper (%)
Pulmão	Ausente	23,08	76,92	38,46	61,54	66,67	33,33	25,00	75,00
	Presente	7,41	92,59	21,43	78,57	75,00	25,00	36,36	63,64
Coração	Ausente	25,00	75,00	46,43	53,57	92,59	7,41	30,00	70,00
	Presente	20,00	80,00	40,00	60,00	73,33	26,67	66,67	33,33
Fígado	Ausente	64,29	35,71	57,14	42,86	92,86	7,14	100,00	0,00
	Presente	63,33	36,67	66,67	42,86	93,10	6,90	81,82	18,18
Rim	Ausente	3,45	96,55	20,69	79,31	75,00	25,00	50,00	50,00
	Presente	12,50	87,50	12,50	87,50	100,00	0,00	0,00	100,00

**Legenda:** tabela com os escores de imuno-histoquímica em associação com os fenótipos inflamatórios de cada topografia (pulmão, coração, fígado e rim). O dano alveolar difuso não está associado diretamente a hiperexpressão do inflamassoma ou de seus subprodutos neste estudo. Entretanto, nas amostras renais, a associação entre o NLRP3 e a IL-1 $\beta$  e IL-18 foi encontrada.

**Fonte:** elaborado pelo autor

Foi observado que a presença de DAD não se associou significativamente à hiperexpressão de NLRP3, Caspase-1 e de IL-1 $\beta$  nos pulmões, apesar de ter resultado na proximidade com o limite de significância estatística para NLRP3 (valor-p = 0,068). A IL-18 mostrou associação estatística com a presença de DAD (valor-p = 0.004). Em relação às associações entre as expressões imuno-histoquímicas dos marcadores NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 com inflamação no coração e no fígado, não foram observados testes com valores estatisticamente significativos. Nas amostras dos rins, cujo fenótipo inflamatório foi representado pela nefrite túbulo-intersticial, os resultados dos testes das associações com os parâmetros de imuno-histoquímica, utilizando os marcadores NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18, mostraram resultados estatisticamente significativos para IL-1 $\beta$  (valor-p = 0,002) e IL-18 (valor-p = 0,005). Os resultados para NLRP3 e Caspase-1 não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Em conjunto, os resultados das associações estatísticas demonstram a hiperexpressão predominante de IL-1 $\beta$  e IL-18 no pulmão e rim e indicam a participação do inflamassoma NLRP3 na resposta inflamatória nestes órgãos.

## 6 DISCUSSÃO

Este trabalho apresentou resultados de acordo com a literatura publicada sobre o assunto e dados relevantes e originais sobre a expressão do inflamassoma e seus produtos em pacientes que foram a óbito pela COVID-19. Além disso, foram descritos os achados morfológicos mais encontrados nesses pacientes em materiais colhidos por meio da autópsia minimamente invasiva, método alternativo à autópsia convencional, que estava contraindicada durante os períodos mais graves da pandemia.

Em destaque, nas amostras pulmonares, topografia mais importante na patogênese desta infecção viral, foram encontrados importantes associações estatísticas entre a IL-18 e o dano alveolar difuso, a lesão pulmonar mais típica e grave da infecção. O inflamassoma NLRP3 apresentou valor estatístico muito próximo do aceito, dessa maneira, seria possível inferir que o produto (IL-18) nas amostras está praticamente relacionado à hiperativação do inflamassoma nesta topografia. É bem provável que, com um tamanho amostral maior, os valores estatísticos apresentariam maior associação. Ainda, houve concordância entre os achados histológicos do nosso estudo com a literatura, reforçando a importância do dano alveolar difuso (CHAMS, *et al.*, 2020; WIERSINGA, *et al.*, 2021; PEREIRA; PASCOAL-XAVIER, 2021). Este, associado a intensidade de quantidade de apoptose de pneumócitos e da presença do infiltrado inflamatório que agride o parênquima pulmonar, o que justifica as alterações morfológicas (MEHTAR, *et al.*, 2021). Outras lesões frequentes foram hemorragia intra-alveolar - possivelmente evento secundário a tromboembolismo pulmonar ou a própria CIVD -, infiltrado inflamatório intersticial e, além disso, áreas de metaplasia escamosa dos pneumócitos e células gigantes multinucleadas foram achados morfológicos ocasionais. Estas, geralmente ocupando parte do espaço alveolar, podem estar presentes como componente do infiltrado inflamatório, sendo capaz de fagocitar material acelular ou restos celulares. As células gigantes multinucleadas não apresentavam padrão granulomatoso nas amostras examinadas. Além disso, em concordância com relatos da literatura, foi possível identificar alguns megacariócitos ocupando focos do parênquima pulmonar (VALDIVIA-MAZEYRA, *et al.*, 2021).

Nas amostras renais, os produtos IL-1 $\beta$  e IL-18 apresentaram forte relação estatística com o fenótipo inflamatório. É sabido que as células renais apresentam alta expressão ACE2, dessa

forma, era esperado que houvesse alta taxa de infecção do parênquima renal pelo vírus. Entretanto, no nosso grupo de pacientes estudados, não houve relação estatística entre as interleucinas e a ativação do NLRP3 diretamente, o que indica que essa produção das interleucinas, nos pacientes com o fenótipo inflamatório, está relacionada com outros processos ou vias, além do próprio inflamassoma. O parênquima renal é rico em interleucinas, e elas são, muitas vezes, encontradas em altas concentrações em processos renais crônicos e em contexto de outras comorbidades associadas (KRISHNAN, *et al.*, 2014; ANDERS, 2016). A necrose tubular aguda foi o achado histológico mais encontrado em nosso estudo é condizente com as descrições na literatura (VALDIVIA-MAZEYRA, *et al.*, 2021). Este achado, pode estar relacionado ao maior tropismo do vírus por células do parênquima renal, conforme comentado anteriormente, lesando o epitélio tubular. Vale ressaltar que este achado não deve estar relacionado diretamente ao tempo de fixação do material ou o tempo de óbito do paciente, uma vez que o material foi colhido em poucos minutos após a declaração de óbito. Entretanto, não é possível descartar totalmente a possibilidade da relação com outras comorbidades do paciente, inclusive com o estado de choque dos casos mais graves. Além disso, a nefrite túbulo-intersticial apresentou relação estatística com os pacientes com diabetes melitus, reforçando este conceito, que as doenças crônicas têm esse caráter pró-inflamatório, agravando o quadro da COVID-19 (MAGNO, 2022). Outros achados morfológicos relevantes foram os quadros de glomerulopatia esclerosante segmentar e focal, com a apresentação atípica dela, a glomerulopatia colapsante, em alguns casos, em consonância com diversos estudos da literatura. A necrose tubular aguda foi um aspecto histopatológico muito típico, relacionado não apenas à injúria das células tubulares pelo vírus, mas também a toda alteração que o organismo sofre durante uma internação em um CTI, como a hipóxia do órgão em um evento de choque, e o próprio mecanismo de óbito, com falência de múltiplos órgãos.

Entretanto, nas topografias do fígado e do coração, não houve relações estatísticas para relacionar a ativação do inflamassoma com as alterações morfológicas inflamatórias. Como o inflamassoma NLRP3, discutido no tópico 2.1.6 do referencial teórico, pode ser ativado de forma direta ou indireta, nossos dados mostram que, no caso destes órgãos, pode ter havido ativação de forma indireta dessa cascata. Um dos mecanismos que corroboram essa via seria a tempestade de citocinas que, com o ambiente rico em citocinas pró-inflamatórias sistêmicas, há ativação de diversas vias intra e extra-celulares em diversos órgãos. Além disso, foi visto que o fígado apresentou padrões de lesões crônicas, como esteatose hepática e/ou alterações

circulatórias, como o fígado do choque, que não estão relacionadas diretamente à injúria do vírus. E o coração mostrou frequentes áreas de fibrose, de aspecto cicatricial, indicando processos de infarto do miocárdio prévios. Estes, não associados diretamente à doença, podem trazer informações indiretas do paciente, como maiores comorbidades, com maior risco para a COVID-19 complicada, internações e óbitos. Nas imagens das amostras que constam neste volume, as áreas de fibrose cardíacas podem corresponder a áreas de infarto ou às adjacências dessa lesão. A biópsia por agulha tem amostragem de área limitada, nem sempre evidenciando os aspectos histopatológicos mais típicos do infarto antigo do miocárdio. Além disso, como forma de representar imagens mais homogêneas, foi optado por evitar aquelas áreas onde havia dobra do fragmento ou artefatos de processamento, o que diminuiu a representatividade em imagem dessas áreas.

A SIRS, uma inflamação multissistêmica, tendo como um dos mecanismos desencadeadores a tempestade de citocinas, foi encontrada na maioria dos pacientes do nosso estudo. Essa síndrome foi abordada neste estudo como a presença de processo inflamatório, pela análise morfológica, em pelo menos dois órgãos distintos. Entretanto, ela também não se mostrou significativa estatisticamente quando comparado a hiperativação do inflamassoma. Vale ressaltar que o paciente internado em CTI apresenta diversas variáveis além da própria infecção pelo SARS-CoV-2, como alterações metabólicas, do pH, uso de medicações variadas, respiração invasiva, dentre outras. Dessa forma, outras vias além do inflamassoma seriam responsáveis por esse estado pró-inflamatório, rico em citocinas e lesões histopatológicas.

De forma semelhante a SIRS, os pacientes dos grupos de evolução rápida e óbito precoce também não mostraram relação direta com a ativação do NLRP3. O que isso indica, é que a intensidade da lesão seria muito mais relevante para o desfecho do óbito do que o próprio tempo de internação ou o tempo de sintomas do paciente. Além disso, pacientes com tempo prolongado de internação têm riscos aumentados de sofrerem infecções secundárias ou oportunistas, algumas delas visualizadas nos exames de MIA, como as pneumonias bacterianas ou pielonefrites agudas (COSTA, *et al.*, 2022).

A pesquisa da presença do vírus nos tecidos examinados não traz tantos dados relevantes, uma vez que após semanas do início da infecção, a carga viral se aproxima de zero e não são encontrados mais material genético do vírus (BOEF, *et al.*, 2021; CAPLAN, *et al.*, 2021; ADACHI, *et al.*, 2020). Dessa forma, o dado mais importante para a análise dos pacientes e

confiabilidade do estudo é o critério rígido de inclusão no grupo de estudo: apenas pacientes que foram internados com quadro confirmado da infecção pelo SARS-CoV-2 no tempo da internação.

Em relação à representatividade das amostras colhidas por meio da MIA, foram estudados critérios já pré-estabelecidos na literatura sobre cada órgão. Detalhadamente, para o coração, que não apresenta critérios específicos, a presença de fibras musculares estriadas cardíacas, no endo e perimísio, é considerado critério suficiente. Eventual lesão representada no fragmento com fibras cardíacas é adequada para análise, independentemente do tamanho da amostra (SUVARNA, Ed. 2019). O pulmão segue critério semelhante ao da amostra cardíaca: se há parênquima pulmonar, principalmente na presença de lesão, considera-se o fragmento suficiente (CORRIN, ANDREW, 2011). Essa noção pode ser empregada com segurança, principalmente porque a técnica da autópsia minimamente invasiva utiliza de métodos de imagem para buscar as áreas onde há a lesão (LI, *et al.* 2005; DUARTE-NETO, *et al.* 2019; BLOKKER, *et al.* 2018; CASTILO, *et al.* 2016; PALHARES, *et al.* 2019; (MONTEIRO, *et al.*, 2020)). De acordo com Cholongitas e colaboradores (2006), que fazem um histórico das avaliações das biópsias por agulha de amostras de fígado, os critérios que definem a real representatividade do fragmento depende do tamanho (comprimento do fragmento) e/ou a quantidade dos tratos portais. O critério mais adequado utilizado atualmente são de 10 ou mais tratos portais ou 20-25 mm de comprimento do fragmento (CHOLONGITAS, *et al.* 2006). Dessa forma, têm-se estatisticamente, a melhor representatividade, em um pequeno fragmento, de todas as alterações do parênquima hepático, principalmente se interpretarmos que as alterações desse órgão se apresentam, em sua maioria, de forma difusa. Das amostras renais, também há discussão na literatura sobre a representatividade das amostras de fragmentos de rim. Em média, deve-se ter algo entre 15-20 glomérulos para considerar a amostra representativa (LUCIANO, MOECKEL, 2019). Entretanto, havendo representação de lesões típicas, mesmo com menor contagem de glomérulos, pode-se aceitar como representativo para o caso em questão (LUCIANO, MOECKEL, 2019). Finalmente, para a análise do parênquima esplênico, é entendido como amostra satisfatória se temos representação de polpa vermelha e polpa branca, independentemente do tamanho da amostra (TABARY, *et al.* 2020).

Com os critérios mostrados acima, tivemos amostras representativas de todos os órgãos de interesse. O número de fragmentos de cada amostra foi uma informação útil para medir e qualificar o quanto do material foi amostrado, principalmente, ajudando a calibrar os critérios

de representatividade comentados acima. Em geral, esperava-se que fossem encontrados números mais padronizados de número de fragmentos, mas esses valores apresentaram grandes variações por, principalmente, o tipo de material e a necessidade de novas tentativas de coletas nas topografias para garantir que haveria material suficiente (ao menos macroscopicamente) para análise histológica após o processamento, ou como no caso do baço, devido a friabilidade do material. Uma outra variável que utilizamos para mitigar esse viés foi o valor do somatório do comprimento dos fragmentos, mostrando uma uniformidade, ou seja, mesmo fragmentados, os órgãos tinham tamanhos semelhantes.

Em geral, as amostras foram majoritariamente representativas, com pequenas variações de acordo com a dificuldade de amostragem de cada topografia. As amostras de coração, fígado e pulmão não apresentaram grandes dificuldades, principalmente pelo acesso e pela posição anatômica. As amostras de rins e baço apresentaram maiores dificuldades, por vezes com material menos representativo. O acesso da agulha aos rins e ao baço apresentou maiores desafios, pela localização retroperitoneal dos rins e mais posterior no abdome, como no caso do baço. Em alguns casos, inclusive, foram obtidos fragmentos de outros órgãos que estavam no trajeto ou na proximidade destes órgãos. O que reduziu o número de biópsias representativas, no somatório final, embora elas tenham mantido uma quantidade relevante para o estudo. Para todos os efeitos, o material colhido foi suficiente para corroborar os achados morfológicos mais descritos na literatura, como mostrado na seção de resultados (seção 5.2 – Descrição das variáveis histopatológicas).

Devido a situação e todas as limitações impostas pela pandemia na época da coleta das amostras, foi selecionada uma quantidade de conveniência de 50 pacientes. Numa possibilidade de estudo futuro, caso esse tamanho amostral for maior, é possível que algumas associações estatísticas possam mostrar-se mais fortes e que talvez haja mais associação do inflamassoma e dos seus produtos do que mostrado neste trabalho. O treinamento da equipe médica que realizou a coleta do material também foi etapa fundamental para que as amostras tenham sido representativas, mas seria interessante fazer o uso de outros métodos de imagem que auxiliam na identificação de mais lesões ou de outros achados morfológicos não abrangidos neste estudo. Ainda, o paciente internado no CTI é multifatorial, havendo muitas outras variáveis e mecanismos imunológicos que fazem parte do contexto do paciente. Uma análise mais ampla e complexa, considerando outros aspectos, como síndromes metabólicas, alterações no pH

sanguíneo, outras possíveis vias de ativação do inflamassoma, dentre outras, seriam interessantes para aprofundar o tema, para se quantificar e analisar.

Por fim, o inflamassoma é uma das vias da inflamação que é hiperativada nos casos de COVID-19, produzindo excesso de interleucinas, em especial a IL-1 $\beta$  e IL-18, além da Caspase-1. Esta inicia o processo de piroptose e as demais participam do processo da tempestade de citocinas, um dos substratos imunológicos da síndrome inflamatória sistêmica. A hiperativação do inflamassoma está relacionado aos achados morfológicos dos pulmões, o órgão mais afetado pela doença, e aos rins, pelo menos indiretamente. Os demais órgãos apresentam alterações morfológicas que se associam ao caráter multifatorial do paciente internado no CTI e com todo o mecanismo de óbito associado. Com esses resultados, é possível prever que drogas que bloqueiam a hiperativação do inflamassoma possam reduzir essa resposta inflamatória exacerbada, reduzindo os danos causados por ela, bem como chamar atenção de pacientes que estão em grupos de risco, em especial os diabéticos. Ainda, em um cenário em que a pandemia ainda não foi erradicada e na possibilidade de outras pandemias futuras causadas por outros vírus, a via do inflamassoma é um caminho para entender, ao menos em parte, a patogênese inflamatória e morfológica das lesões, abrindo novos caminhos para o estudo da doença, de tratamentos e de prevenção.

## 7 CONCLUSÃO

Este trabalho estudou as alterações histopatológicas da COVID-19 e a ativação do inflamassoma NLRP3 em amostras de pulmão, coração, fígado, baço e rins colhidos por meio da técnica da autópsia minimamente invasiva, contribuindo para o melhor entendimento da COVID-19 e da participação do inflamassoma NLRP3 nas lesões teciduais.

Os resultados do estudo permitem concluir que a autópsia minimamente invasiva possibilita adequado exame anatomopatológico para verificação do óbito e que a COVID-19 fatal apresenta importante componente inflamatório sistêmico, com participação do inflamassoma NLRP3.

Estudos complementares estão indicados para aprofundamento e expansão dessas conclusões, considerando a importância da vigilância do óbito e das abordagens farmacológicas para a redução de danos dessa resposta inflamatória exacerbada.

**REFERÊNCIAS**

- ADACHI, T., CHONG, J.M., NAKAJIMA, N., SANO, M., YAMAZAKI, J., MIYAMOTO, I., NISHIOKA, H., AKITA, H., SATO, Y., KATAOKA, M., KATANO, H., TOBIUME, M., SEKIZUKA, T., ITOKAWA, K., KURODA, M., SUZUKI, T.. Clinicopathologic and Immunohistochemical Findings from Autopsy of Patient with COVID-19, Japan. *Emerg Infect Dis*. Vol.26(9):2157–61. Sep. 2020. doi: 10.3201/eid2609.201353.
- ANDERS, H.J. Of Inflammasomes and Alarmins: IL-1 $\beta$  and IL-1 $\alpha$  in Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. Vol. 27(9):2564-75. Sep. 2016. doi: 10.1681/ASN.2016020177.
- BANSAL, M. Cardiovascular disease and COVID-19. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev*. Vol. 14:247–50. 2020. doi: 10.1016/j.dsx.2020.03.013
- BARBOSA, G.M. Estudo clinicopatológico de fatores prognósticos da COVID-19 fatal. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz. 2022.
- BHARDWAJ, A., SAPRA, L., SAINI, C., AZAM, Z., MISHRA, P. K., VERMA, B., SRIVASTAVA, R. K. COVID-19: immunology, immunopathogenesis and potential therapies. *International reviews of immunology*. Vol. 41(2), 171-206. 2022.
- BHASKAR, S., SINHA, A., BANACH, M., MITTOO, S., WEISSERT, R., KASS, J.S., RAJAGOPAL, S., PAI, A.R., KUTTY, S.. Cytokine Storm in COVID-19- Immunopathological Mechanisms, Clinical Considerations, and Therapeutic Approaches: The REPROGRAM Consortium Position Paper. *Front Immunol*. Vol.10;11:1648. Jul, 2020. doi: 10.3389/fimmu.2020.01648.
- BLOKKER, B.M., WAGENSVELD, I.M., WEUSTINK, A.C., OOSTERHUIS, J.W., HUNINK, M.G. Non-invasive or minimally invasive autopsy compared to conventional autopsy of suspected natural deaths in adults: a systematic review. *Eur Radiol*. Vol.26(4):1159-1179. 2016. doi:10.1007/s00330-015-3908-8.
- BLOKKER, B.M., WEUSTINK, A.C., WAGENSVELD, I.M., VON DER THUSEN, J.H., PEZZATO, A., DAMMERS, R., *et al*. Conventional Autopsy versus Minimally Invasive Autopsy with Postmortem MRI, CT, and CT-guided Biopsy: Comparison of Diagnostic Performance. *Radiology*. Vol. 289(3):658-67. 2018. doi:10.1148/radiol.2018180924.
- BOEF, A.G.C., VAN WEZEL, E.M., GARD, L., NETKOVA, K., LOKATE, M., van der VOORT, P.H.J., NIESTERS, H.G.M., Van LEER BUTER, C.. Viral load dynamics in intubated patients with COVID-19 admitted to the intensive care unit. *J Crit Care*. Vol. 64:219-225. Aug, 2021. doi: 10.1016/j.jcrc.2021.04.010.
- BÖSMÜLLER, H., MATTER, M., FEND, F., TZANKOV, A.. The pulmonary pathology of COVID-19. *Virchows Arch*. Vol. 478(1):137-150. Jan, 2021. doi: 10.1007/s00428-021-03053-1.

BROZ, P., & DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature Reviews Immunology*, 16(7), 407-420. 2016.

CALDAS, L.A., CARNEIRO, F.A., HIGA, L.M. *et al.* Ultrastructural analysis of SARS-CoV-2 interactions with the host cell via high resolution scanning electron microscopy. *Sci Rep* 10, 16099. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73162-5>.

CAPLAN, A., BATES, K.W., BRIONI, C., SANTOS, A., SABATINI, L.M., KAUL, K.L., *et al.* Clinical characteristics and viral load dynamics of COVID-19 in a mildly or moderately symptomatic outpatient sample. *PLoS ONE* 16(10): e0258970. 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258970>

CASTILLO, P., USSENE, E., ISMAIL, M.R., JORDAO, D., LOVANE, L., CARRILHO, C., *et al.* Pathological Methods Applied to the Investigation of Causes of Death in Developing Countries: Minimally Invasive Autopsy Approach. *PLoS One*. Vol. 10(6):e0132057. 2015.

CASTILLO, P., MARTÍNEZ, M.J., USSENE, E., JORDAO, D., LOVANE, L., ISMAIL, M.R., CARRILHO, C., LORENZONI, C., FERNANDES, F., BENE, R., PALHARES, A.. Validity of a minimally invasive autopsy for cause of death determination in adults in Mozambique: an observational study. *PLoS medicine*. Vol. 22;13(11):e1002171. Nov, 2016.

CHAMS, N., CHAMS, S., BADRAN, R., SHAMS, A., ARAJI, A., RAAD, M., MUKHOPADHYAY, S., STROBERG, E., DUVAL, E.J., BARTON, L.M., HAJJ HUSSEIN, I. COVID-19: a multidisciplinary review. *Frontiers in public health*. Vol. 29;8:383. Jul, 2020.

CHEN, I. Y., MORIYAMA, M., CHANG, M. F. & ICHINOHE, T. Severe acute respiratory syndrome coronavirus viroporin 3a activates the NLRP3 inflammasome. *Front. Microbiol.* Vol. 10, n.50. 2019.

CHENG, Y., LUO, R., WANG, K., ZHANG, M., WANG, Z., DONG, L., *et al.* Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19. *Kidney Int.* Vol. 97:829–38. 2020. doi: 10.1016/j.kint.2020.03.005.

CHOLONGITAS, E., SENZOLO, M., STANDISH, R., MARELLI, L., QUAGLIA, A., PATCH, D., DHILLON, A.P., BURROUGHS, A.K.. A systematic review of the quality of liver biopsy specimens. *American journal of clinical pathology*. 1;125(5):710-21. May, 2006.

Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 5, 536–544 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>

CORRIN, B., NICHOLSON, A.G.. *Pathology of the Lungs E-Book: Expert Consult: Online and Print*. Elsevier Health Sciences, 2011.

COSTA, R.L., LAMAS, C.D., SIMVOULIDIS, L.F., ESPANHA, C.A., MOREIRA, L.P., BONANCIM, R.A., WEBER, J.V., RAMOS, M.R., SILVA, E.C., OLIVEIRA, L.P.. Secondary infections in a cohort of patients with COVID-19 admitted to an intensive care unit: impact of gram-negative bacterial resistance. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. Vol. 2;64. Fev, 2022.

- CUCINOTTA, D., VANELLI, M.. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta bio-medica: Atenei Parmensis*. Vol. 91(1):157-60. 2020.
- DE CAMPOS, F.P., ROCHA, L.O.. The pedagogical value of autopsy. *Autops Case Rep*. Vol.30;5(3):1-6. doi: 10.4322/acr.2015.011. Sep, 2015.
- DE ZOETE, M.R., PALM, N.W., ZHU, S., FLAVELL, R.A.. Inflammasomes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Vol. 16;6(12):a016287. Oct, 2014. doi:10.1101/cshperspect.a016287.
- DUARTE-NETO, A.N., MONTEIRO, R.A.A., JOHNSON, J., CUNHA, M.D.P., POUR, S.Z., SARAIVA, A.C., *et al*. Ultrasound-guided minimally invasive autopsy as a tool for rapid post-mortem diagnosis in the 2018 Sao Paulo yellow fever epidemic: Correlation with conventional autopsy. *PLoS neglected tropical diseases*. Vol.13(7):e0007625. 2019.
- FAJGENBAUM, D.C., JUNE, C.H.. Cytokine storm. *New England Journal of Medicine*. 3;383(23):2255-73. Dec, 2020.
- FELSENSTEIN, S., HERBERT, J.A., MCNAMARA, P.S., HEDRICH, C.M.. COVID-19: Immunology and treatment options. *Clin Immunol*. Vol.215:108448. Jun, 2020. doi: 10.1016/j.clim.2020.108448.
- FERNANDES, F., CASTILLO, P., BASSAT, Q., QUINTO, L., HURTADO, J.C., MARTINEZ, M.J., *et al*. Contribution of the clinical information to the accuracy of the minimally invasive and the complete diagnostic autopsy. *Hum Pathol*. 85:184-93. 2019.
- GUAN, W.J., NI, Z.Y., HU, Y., LIANG, W.H., OU, C.Q., HE, J.X., *et al*. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *The New England journal of medicine*. 2020.
- HADJ HASSINE, I. "Covid-19 vaccines and variants of concern: A review." *Reviews in medical virology*, e2313. 9. Nov. 2021. doi:10.1002/rmv.2313
- HE, Y., HARA, H., NÚÑEZ, G.. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci*. Vol. 41(12):1012-1021. Dec, 2016. doi:10.1016/j.tibs.2016.09.002.
- HOJYO, S., UCHIDA, M., TANAKA, K., HASEBE, R., TANAKA, Y., MURAKAMI, M., HIRANO, T.. How COVID-19 induces cytokine storm with high mortality. *Inflamm Regen*. Vol. 1;40:37. Oct, 2020. doi:10.1186/s41232-020-00146-3.
- HU, B., GUO, H., ZHOU, P. *et al*. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* 19, 141–154. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>.
- HUANG, C., WANG, Y., LI, X., REN, L., ZHAO, J., HU, Y., *et al*. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet Lond Engl*. Vol. 395:497–506. 2020. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
- JIN, Y., YANG, H., JI, W., WU, W., CHEN, S., ZHANG, W., *et al*. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of COVID-19. *Viruses*. Vol. 12:372. 2020. doi: 10.3390/v12040372

KAKODKAR, P., KAKA, N., BAIG, M.. A comprehensive literature review on the clinical presentation, and management of the pandemic coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Cureus*. Vol. 12:e7560. doi: 10.7759/cureus.7560. 2020.

SCHRODER, K., TSCHOPP, J.. "The inflammasomes." *Cell* 140, no. 6 : 821-832. 2010.

KRISHNAN, S.M., SOBEY, C.G., LATZ, E., MANSELL, A., DRUMMOND, G.R.. IL-1 $\beta$  and IL-18: inflammatory markers or mediators of hypertension? *Br J Pharmacol*. Vol.171(24):5589-602. Dec, 2014. doi:10.1111/bph.12876.

LI, L., GU, J., SHI, X., GONG, E., LI, X., SHAO, H., *et al*. Biosafety level 3 laboratory for autopsies of patients with severe acute respiratory syndrome: principles, practices, and prospects. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. Vol.41(6):815-21. 2005. doi:10.1086/432720

LUCIANO, R.L., MOECKEL, G.W.. Update on the native kidney biopsy: core curriculum 2019. *American Journal of Kidney Diseases*. Vol. 1;73(3):404-15. Mar, 2019.

MARIK, P.E., TAEB, A.M.. SIRS, qSOFA and new sepsis definition. *J Thorac Dis*. Vol. 9(4):943-945. Apr, 2017. doi:10.21037/jtd.2017.03.125.

MEHTA, O.P., BHANDARI, P., RAUT, A., KACIMI, S.E., HUY, N.T.. Coronavirus disease (COVID-19): comprehensive review of clinical presentation. *Frontiers in Public Health*. Vol. 15;8:582932. Jan, 2021.

MENDES, A. L. G., JOAQUIM, H. D. M., ZAMAE, M. I. S., ASSIS, R. M., PEIXOTO, J. R. D. M., DE ARAÚJO, M. M. G., ... & PASCOAL-XAVIER, M. A. (2020). Expression of NLRP3 inflammasome in leprosy indicates immune evasion of *Mycobacterium leprae*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 115.

MONTEIRO, R.A., DUARTE-NETO, A.N., SILVA, L.F., OLIVEIRA, E.P., SANTOS, G.A., OLIVEIRA, I.R., MAUAD, T., SALDIVA, P.H., DOLHNIKOFF, M.. Ultrasound-guided minimally invasive autopsies: A protocol for the study of pulmonary and systemic involvement of COVID-19. *Clinics*. 2020 May 29;75.

PALHARES, A.E.M., FERREIRA, L., FREIRE, M., CASTILLO, P., MARTINEZ, M.J., HURTADO, J.C., *et al*. Performance of the minimally invasive autopsy tool for cause of death determination in adult deaths from the Brazilian Amazon: an observational study. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2019.

PAN, L., MU, M., YANG, P., SUN, Y., WANG, R., YAN, J., *et al*. Clinical characteristics of covid-19 patients with digestive symptoms in hubei, china: a descriptive, cross-sectional, multicenter study. *Am J Gastroenterol*. (2020) 115, 766–73. doi: 10.14309/ajg.0000000000000620.

PAN, P., SHEN, M., YU, Z. *et al*. SARS-CoV-2 N protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce hyperinflammation. *Nat Commun* 12, 4664 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25015-6>.

PEREIRA, F.E.L., PASCOAL-XAVIER, M.A.. Etiogênese Geral das Lesões. In: BRASILEIRO FILHO, G.. *Bogliolo Patologia*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021. p. 31-64.

PERLMAN, S., DANDEKAR, A.A.. Immunopathogenesis of coronavirus infections: implications for SARS. *Nat Rev Immunol*. 2005 Dec;5(12):917-27. doi: 10.1038/nri1732.

MONDELLO, C., ROCCUZZO, S., MALFA, O., SAPIENZA, D., GUALNIERA, P., VENTURA SPAGNOLO, E., DI NUNNO, N., SALERNO, M., POMARA, C., ASMUNDO, A.. Pathological findings in COVID-19 as a tool to define SARS-CoV-2 pathogenesis. A systematic review. *Frontiers in pharmacology*. 2021 Apr 1;12:614586.

RAMOS-CASALS, M., BRITO-ZERÓN, P., MARIETTE, X. Systemic and organ-specific immune-related manifestations of COVID-19. *Nat Rev Rheumatol* 17, 315–332 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41584-021-00608-z>

SHARMA, A., AHMAD FAROUK, I., LAL, S. K. COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. *Viruses*, 13(2), 202. 2021. <https://doi.org/10.3390/v13020202>

SOKOLOWSKA, M., LUKASIK, Z.M., AGACHE, I., AKDIS, C.A., AKDIS, D., AKDIS, M., BARCIK, W., BROUGH, H.A., EIWEGGER, T., ELJASZEWICZ, A. AND EYERICH, S.. Immunology of COVID-19: mechanisms, clinical outcome, diagnostics, and perspectives—a report of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI). *Allergy*, 75(10), pp.2445-2476. Oct, 2020.

SUVARNA, S.K., (ed.). *Cardiac pathology: a guide to current practice*. Springer Nature, 2019.

SWANSON, K.V., DENG, M., TING, J.PY. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* 19, 477–489. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>

TABARY, M., KHANMOHAMMADI, S., ARAGHI, F., DADKHAHFAR, S., & TAVANGAR, S. M. Pathologic features of COVID-19: A concise review. *Pathology, research and practice*, 216(9), 153097. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.153097>

TAKANO K, KONDO A, KUROSE M, YAMASHITA K, NOMURA K, OBATA K, MURAYAMA K, ITO F, HIMI T. Expression of Inflammasome-Associated Proteins in Human Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Adv Otorhinolaryngol*. 2016;77:98-104. doi: 10.1159/000441884.

RODRIGUES, T.S., DE SÁ, K.S., ISHIMOTO, A.Y., BECERRA, A., OLIVEIRA, S., ALMEIDA, L., GONÇALVES, A.V., PERUCELLO, D.B., ANDRADE, W.A., CASTRO, R., VERAS, F.P.. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *Journal of Experimental Medicine*. 2021 Mar 1;218(3). doi: <https://doi.org/10.1084/jem.20201707>

TAY MZ, POH CM, RÉNIA L, MACARY PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol.* (2020) 20:363–74. doi: 10.1038/s41577-020-0311-8

VALDIVIA-MAZEYRA MF, SALAS C, NIEVES-ALONSO JM, MARTÍN-FRAGUEIRO L, BÁRCENA C, MUÑOZ-HERNÁNDEZ P, VILLAR-ZARRA K, MARTÍN-LÓPEZ J, RAMASCO-RUEDA F, FRAGA J, JIMÉNEZ-HEFFERNAN JA. Increased number of pulmonary megakaryocytes in COVID-19 patients with diffuse alveolar damage: an autopsy study with clinical correlation and review of the literature. *Virchows Arch.* 2021 Mar;478(3):487-496. doi: 10.1007/s00428-020-02926-1. Epub 2020 Sep 11. PMID: 32915265; PMCID: PMC7483503.

van de VEERDONK FL, NETEA MG, DINARELLO CA, JOOSTEN LA. Inflammasome activation and IL-1 $\beta$  and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol.* 2011 Mar;32(3):110-6. doi: 10.1016/j.it.2011.01.003. Epub 2011 Feb 18. PMID: 21333600.

WAGENSVELD IM, HUNINK MGM, WIELOPOLSKI PA, van KEMENADE FJ, KRESTIN GP, BLOKKER BM, et al. Hospital implementation of minimally invasive autopsy: A prospective cohort study of clinical performance and costs. *PLoS One.* 2019;14(7):e0219291.

WAGENSVELD IM, HUNINK MGM, WIELOPOLSKI PA, van KEMENADE FJ, KRESTIN GP, BLOKKER BM, OOSTERHUIS JW, WEUSTINK AC. Hospital implementation of minimally invasive autopsy: A prospective cohort study of clinical performance and costs. *PLoS One.* 2019 Jul 16;14(7):e0219291. doi: 10.1371/journal.pone.0219291. PMID: 31310623; PMCID: PMC6634385.

WIERSINGA WJ, RHODES A, CHENG AC, PEACOCK SJ, PRESCOTT HC. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA.* 2020;324(8):782–793. doi:10.1001/jama.2020.12839

XIAO K., ZHAI J., FENG Y., XHOU N., ZHANG X., ZOU J.J., NA L., YAQIONG G., XIAOBING L., XUEJUAN S., et al. Isolation and characterization of 2019-nCoV-like coronavirus from Malayan Pangolins. *bioRxiv.* 2020 doi: 10.1101/2020.02.17.951335.

ZHAO N, DI B, XU LL. The NLRP3 inflammasome and COVID-19: Activation, pathogenesis and therapeutic strategies. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2021 Oct;61:2-15. doi: 10.1016/j.cytogfr.2021.06.002. Epub 2021 Jun 18. PMID: 34183243; PMCID: PMC8233448.

ZHOU F, YU T, DU R, FAN G, LIU Y, LIU Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet (London, England).* 2020;395(10229):1054-62.

ZHOU, B., THAO, T.T.N., HOFFMANN, D. et al. SARS-CoV-2 spike D614G change enhances replication and transmission. *Nature* 592, 122–127 (2021).  
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03361-1>