



ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM PACIENTES COM COVID-19 NO OESTE DA BAHIA

DAVI FARIA ROCHA DE CASTRO; JONILSON BERLINK LIMA

RESUMO

A pandemia de COVID-19 levou o mundo a uma série de intercorrências nas mais diversas esferas que compõem a sociedade. O agente etiológico dessa doença, SARS-CoV-2, adere e penetra as células hospedeiras a partir de interações entre a glicoproteína S e os receptores ECA-2 presentes na superfície das células alvo. Embora os mecanismos fisiopatológicos não estejam precisamente descritos, sabe-se que fatores como a desregulação do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) e a formação de anticorpos disfuncionais estão associados com desregulações na resposta imunológica. Durante a progressão natural da COVID-19, apenas 15% dos infectados necessitam de cuidados hospitalares. Essas formas graves da doença estão associadas com frequência a estados de hiperinflamação modulados por variadas citocinas. Nesse sentido, observa-se a necessidade de conhecer a dinâmica de produção dessas moléculas em grupos com diferentes quadros clínicos. O presente estudo tem como objetivo quantificar as concentrações séricas das citocinas; IL-5, IL-6, IL-7, IP-10, MIG, PDGF, IL-1 β , TNF- α , GRO- α e IL-18 em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 no Oeste da Bahia e comparar os resultados entre grupos de diferentes desfechos clínicos. As citocinas foram quantificadas utilizando a tecnologia Luminex XMAP e posteriormente foram feitas análises de variância unidirecionais com múltiplas comparações entre quatro grupos, COVID-19 negativo, COVID-19 positivo não hospitalizado, COVID-19 positivo hospitalizado e curados. Os testes feitos com as citocinas MIG, IP-1- e IL-18 demonstraram estar elevados no grupo COVID-19 positivo grave, enquanto a IL-7, IL-5, PDGF e GRO-alfa estavam em maior quantidade no grupo de pacientes curados comparado com o restante dos grupos. Não foram encontradas diferenças significativas nas análises com IL-6, TNF-alfa e IL-1Beta.

Palavras-chave: Inflamação; Interleucina; Coronavírus; Imunologia; Hospitalização.

1 INTRODUÇÃO

Os primeiros casos de COVID-19 foram reportados em dezembro de 2019 na cidade de Wuhan, na China, esses pacientes eram admitidos comumente com febre, tosse seca e dispneia (Wu, *et al.*, 2020). Em março de 2020 já haviam sido identificados cerca de 118 mil casos em 114 países quando a situação passou então a ser tratada como uma pandemia pela Organização Mundial da Saúde. Atualmente, em junho de 2024, cerca de 695 milhões de pessoas foram infectadas e 6,91 milhões de pessoas vieram a óbito. No Brasil, esses números chegaram a 38 milhões de casos e cerca de 712 mil óbitos (Organização Mundial da Saúde, 2024).

O agente etiológico da COVID-19, *Betacoronavirus* SARS-CoV-2, é um vírus envolto por camada lipídica contendo RNA fita simples de polaridade positiva encapsulado pela proteína nuclear (N). Nesse envelope lipídico estão incorporadas três proteínas transmembrana: proteína spike (S), proteína de membrana (M) e proteína de envelope (E) (Zunlong, *et al.*, 2020). O tropismo do vírus pelos tecidos humanos acontece a partir da interação entre a proteína S e receptores hECA2 presentes na superfície das células alvo (De Almeida. *et al.*, 2020). Além da adesão, a ligação entre essas moléculas é uma etapa fundamental para a entrada do capsídeo no citosol.

A resposta inflamatória fisiológica decorrente da infecção por SARS-CoV-2 manifesta-se clinicamente na forma de febre, tosse seca e outros sintomas brandos (Guang, *et al.*, 2020). No entanto, nos pacientes que desenvolvem formas graves de COVID-19, é observado com frequência uma desregulação da resposta imune levando o indivíduo a um estado patológico de hiperinflamação. Esse fenômeno, conhecido como tempestade de citocinas é caracterizado pela produção desproporcional de citocinas pró-inflamatórias pelo sistema imunológico (Wang, *et al.*, 2020).

Esse evento vem sendo associado a produção de anticorpos IgG disfuncionais pelos linfócitos B. Essa associação surgiu após a constatação de que a piora dos pacientes coincidia muitas vezes com o início da produção dessas imunoglobulinas (Hoepel, *et al.*, 2021) O mecanismo de inflamação proposto é de que IgGs anti-proteína S em pequenas concentrações ou com baixa afinidade permitem a entrada do vírus em macrófagos após a ligação do complexo anti-S-IgG-vírus aos receptores Fc dessas células (Sokolowska, *et al.*, 2020).

Outra hipótese para a patogênese da tempestade de citocinas é a perda de função dos receptores hECA2 ao serem internalizadas juntamente com o vírus em seu processo de entrada nas células hospedeiras (Mahmudpour, *et al.*, 2020). Sabe-se que eles compõem um dos mecanismos regulatórios do Sistema-Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) ao metabolizar a angiotensina II (ANG-2) em angiotensina 1-7 (ANG 1-7) (Santos, *et al.*, 2018). Esse último produto age contrabalanceando os efeitos vasopressores e pró-inflamatórios da ANG-2 (Bourgonje; Abdulle., 2020). Nesse sentido, alguns estudos vêm sugerindo que essa baixa expressão de hECA2 causada pelo SARS-CoV-2 leva a alterações no SRAA que contribuem para a inflamação e complicações vasculares comumente observadas nos pacientes com COVID-19 (Tay, *et al.*, 2020).

A COVID-19 manifesta-se na grande maioria dos casos de forma branda ou assintomática enquanto cerca de 15% dos infectados evoluem para quadros graves que necessitem de internação. Os principais determinantes para que essas complicações ocorram são desregulações na resposta imunológica contra o SARS-CoV-2. Dentre as possíveis hipóteses para que esse tipo de desregulação ocorra, todas elas possuem uma consequência final em comum; a produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias conhecida como tempestade de citocinas. Nesse sentido, o presente estudo tem como objetivo quantificar os níveis séricos de 10 dessas moléculas e comparar entre quatro grupos de pacientes com diferentes desfechos clínicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 POPULAÇÃO A SER ESTUDADA

Os participantes desse estudo são indivíduos residentes no Oeste da Bahia que passaram por coleta de material biológico (swab nasofaríngeo ou sangue total) para que o Laboratório de Diagnóstico molecular da Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB) pudesse realizar testes diagnósticos. Ao todo são 114 pacientes divididos em quatro grupos: negativos (N=30), positivos não hospitalizados (N=26), positivos hospitalizados (N=30) e curados (N=28).

TABELA 1- PROPORÇÕES DE SEXO E MÉDIA DA IDADE DA POPULAÇÃO ESTUDADA DADOS DEMOGRÁFICOS

MASCULINO	49 (43%)
FEMININO	65 (57%)
IDADE (MÉDIA)	28,5

2.2 DOSAGEM DE CITOCINAS

2.2.1 Princípios da técnica de dosagem

A dosagem das citocinas selecionadas foi feita a partir de amostras de sangue total dos participantes que estavam armazenadas em freezer a -80°C , utilizando técnica Luminex® - xMAP® (Luminex Corp., Austin, TX). Esse método possui princípios similares ao ensaio de imuno absorção enzimática (ELISA) sanduíche, mas diferente desse, permite que múltiplas proteínas sejam analisadas simultaneamente em um único poço. Para tal, os ensaios utilizam a tecnologia xMAP que consiste em três passos principais:

- 1) Anticorpos específicos se ligam a diferentes microesferas magnéticas (beads) correspondentes a cada analito de interesse. Esse mecanismo é representado pela figura 3, onde citocinas são associadas a diferentes microesferas.
- 2) Após a formação dos conjuntos beads-anticorpos, eles são misturados com as amostras que estão disponibilizadas em placas de 96-well. Isso leva a ligação dos analitos em cada conjunto correspondente.
- 3) Por fim, anticorpos de detecção marcados com fluorescência (ficoeritrina) específicos para cada analito são adicionados para a formação do sanduíche anticorpo-antígeno- anticorpo. Isso permite que o instrumento Luminex determine a magnitude de cada citocina nas amostras.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados brutos obtidos após a leitura no Luminex foram organizados em uma planilha excel de acordo com cada grupo correspondente às amostras; negativos, positivos não hospitalizados, positivos hospitalizados e curados. Em seguida foram feitas análises de variâncias unidirecionais utilizando o software PRISMA versão 8.0 (Excoffier; Lischer, 2010) a fim de comparar os níveis de cada citocina estudada entre os 4 grupos selecionados.

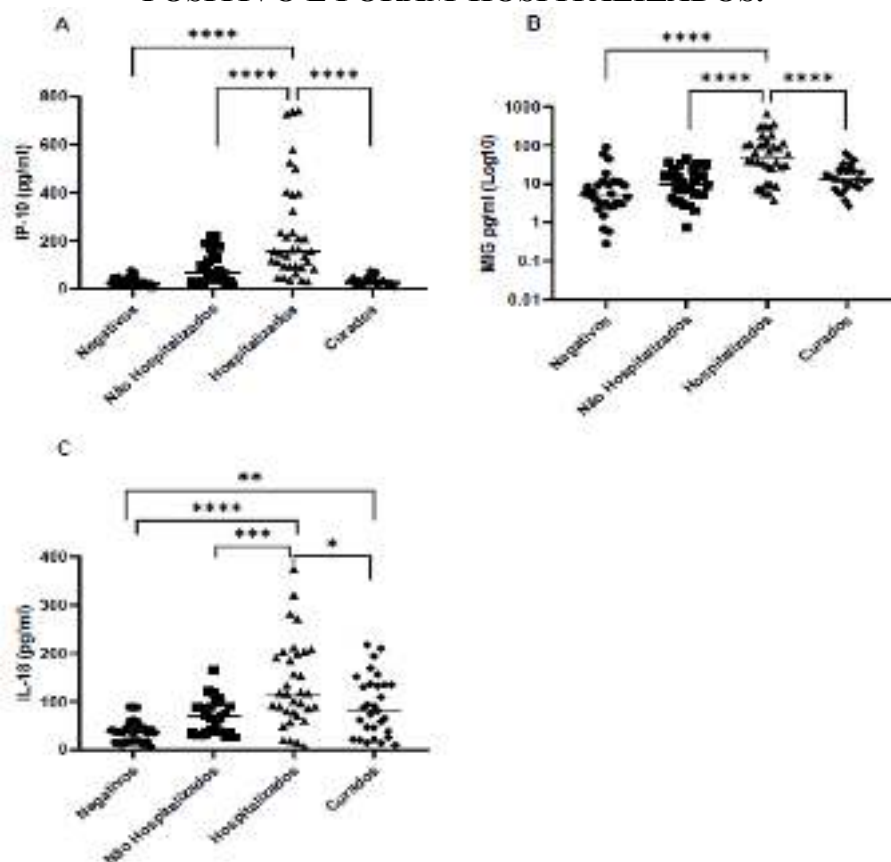
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CORRELAÇÕES ENTRE CITOCINAS DE PERFIL TH1 E PACIENTES QUE NECESSITAM HOSPITALIZAÇÃO

Após a realização das análises de variância com múltiplas comparações de cada citocina quantificada, foram observadas diferenças estatísticas com diversos níveis de significâncias representados nos gráficos por; $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$ e $p < 0,0001 = ****$. Nos testes feitos com as citocinas IP-10 e MIG, (Figura 5, A e B), foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo COVID-19 positivos graves e o restante dos grupos

(ANOVA – valor de $p < 0,0001$). Tais citocinas possuem uma íntima relação no desencadeamento de processos inflamatórios, pois ambas são induzidas por interferon gama e atuam como agentes quimiotáticos para células T, NK, dendríticas e monócitos/macrófagos (Chen *et al.* 2020). Na mesma linha, a figura 6 (item C) revela a existência de diferenças significativas entre os pacientes graves e os demais grupos nos testes feitos com a citocina IL-Essa, por sua vez, também está relacionada com perfil de resposta TH1 associado ao interferon gama, mas diferente da IP-10 e MIG, atua estimulando a produção desse (Ochoa-Ramírez, *et al.*, 2022).

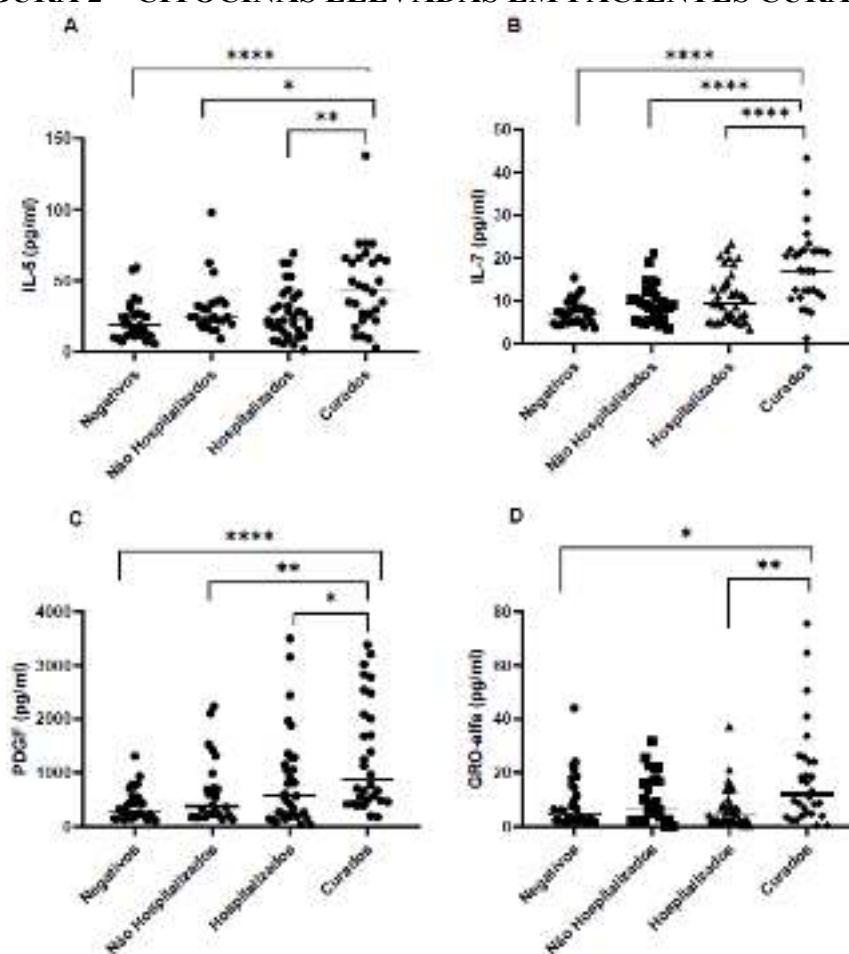
FIGURA 1 – CITOCINAS ELEVADAS EM PACIENTES QUE TESTARAM POSITIVO E FORAM HOSPITALIZADOS.



CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE: (A) IP-10. (B) MIG. (C) IL—18. TESTE ONE-WAY ANOVA, * P<0,05; ** P<0,01, *** P<0,001,**** P<0,0001.

3.2 CORRELAÇÕES ENTRE O GRUPO DE PACIENTES CURADOS E ALTOS NÍVEIS DE CITOCINAS ASSOCIADAS AO DESENVOLVIMENTO DE LINFÓCITOS B

Os testes realizados com as citocinas IL-5, IL-7 E PDGF (Figura 6; A, B e C) revelaram diferenças estatísticas significantes entre o grupo de pacientes curados e todos os demais. Essas diferenças foram ainda mais expressivas nas dosagens da IL-7, em que todas as comparações demonstraram o valor de $p < 0,0001$. Essa citocina atua no desenvolvimento de linfócitos B ao ativar uma de suas formas precursoras. Nessa mesma linha a IL-5 (figura 6; B), citocina produzida por células Th2, induz a proliferação de linfócitos B, além de atuar na diferenciação para a produção de anticorpos IgG (Moon, *et al.*, 2004). Já os valores elevados de PDGF (figura 6, C) em pacientes que se recuperaram da COVID-19 podem indicar a ocorrência de regeneração dos tecidos lesados pela infecção viral, uma vez que essa citocina é um importante indutor mitótico (Ma, *et al.*, 2021). Ademais, a figura 6, item D representa o teste com a citocina GRO-alfa, em que foi constatado significâncias entre os pacientes negativos e COVID-19 positivos graves com o grupo de curados.

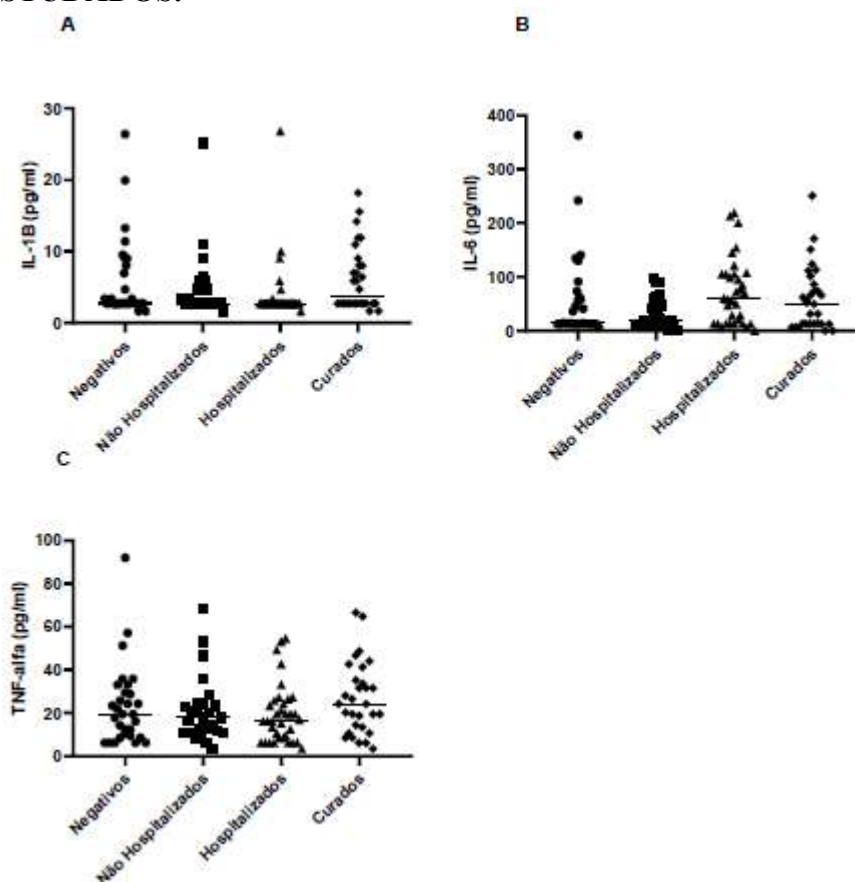
FIGURA 2 – CITOCINAS ELEVADAS EM PACIENTES CURADOS.

CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE; (A) IL-5. (B) IL-7. (C) PDGF E (D) GRO-ALFA.
 TESTE ONE-WAY ANOVA, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$.

3.3 CITOCINAS EM QUE NÃO FORAM CONSTATADAS DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS GRUPOS

A figura 7 (A, B e C) representa os testes feitos com as citocinas IL-1Beta, IL-6 e TNF-alfa respectivamente. Não foram encontradas diferenças significativas (valor de $p < 0,05$) em nenhuma das 3 análises. Devido as propriedades pro-inflamatórias dessas citocinas, era esperado que houvesse maiores concentrações no grupo de pacientes que testaram positivos e evoluíram para casos graves assim como observados em outros estudos (A. Ghazavi, *et al.*, 2021). Isso pode indicar mudanças na população selecionado ou no método de quantificação utilizado.

FIGURA 3 – CITOCINAS EM QUE NÃO HOUVE AUMENTO EM NENHUM DOS GRUPOS ESTUDADOS.



CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE. (A) IL-1BETA. (B) IL-6. (C) TNF-ALFA. TESTE ONE-WAY ANOVA; VALOR DE $P > 0,05$ EM TODAS AS COMPARAÇÕES.

4 CONCLUSÃO

O presente trabalho descreve a dosagem de 10 importantes citocinas para vias inflamatórias em pacientes testados para COVID-19 no Oeste da Bahia. Após análises, foi possível concluir que o perfil de resposta inflamatória Th1 foi predominante nos pacientes que evoluíram para formas graves da doença. Além disso, também foi observado aumento significativo de citocinas associadas ao processo de desenvolvimento de linfócitos B no grupo de pacientes com desfecho clínico favorável. Os níveis séricos das citocinas IL-6, IL-1Beta e TNF-Alfa não apresentaram diferenças significativas entre os quatro grupos estudados.

REFERÊNCIAS

- BEKELE, Y.; SUI, Y.; BERZOFISKY, J. A. IL-7 in SARS-CoV-2 Infection and as a Potential Vaccine Adjuvant. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 17 set. 2021.
- BOURGONJE, A. R. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), SARS-CoV-2 and the pathophysiology of coronavirus disease 2019 (COVID-19). **The Journal of Pathology**, v. 251, n. 3, p. 228–248, 10 jul. 2020.
- CHEN, G. et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 5, p. 2620–2629, 13 abr. 2020a.

CHEN, Y. et al. IP-10 and MCP-1 as biomarkers associated with disease severity of COVID-**Molecular Medicine**, v. 26, n. 1, p. 97, 29 dez. 2020b.

FU, Y.; CHENG, Y.; WU, Y. Understanding SARS-CoV-2-Mediated Inflammatory Responses: From Mechanisms to Potential Therapeutic Tools. **Virologica Sinica**, v. 35, n. 3, p. 266–271, 3 jun. 2020.

HOEPEL, W. et al. High titers and low fucosylation of early human anti–SARS-CoV-2 IgG promote inflammation by alveolar macrophages. **Science Translational Medicine**, v. 13, n. 596, 2 jun. 2021.

HU, B.; HUANG, S.; YIN, L. The cytokine storm and COVID-19. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 1, p. 250–256, 30 jan. 2021.

KE, Z. et al. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. **Nature**, v. 588, n. 7838, p. 498–502, 17 dez. 2020.

MA, S. et al. PDGF-D–PDGFR β signaling enhances IL-15–mediated human natural killer cell survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 3, 18 jan. 2022.

MAHMUDPOUR, M. et al. COVID-19 cytokine storm: The anger of inflammation. **Cytokine**, v. 133, p. 155151, set. 2020.

MOON, B. et al. The Role of IL-5 for Mature B-1 Cells in Homeostatic Proliferation, Cell Survival, and Ig Production. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 10, p. 6020–6029, 15 maio 2004.

OCHOA-RAMIREZ, L. A. et al. The Chemokine MIG is Associated with an Increased Risk of COVID-19 Mortality in Mexican Patients. **Iranian Journal of Immunology**, v. 19, n. 3, p. 311–320, 1 set. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **COVID-19 Dashboard**. 2024. Disponível em: <<https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?n=c>> Acesso em: 24 jul. 2024.

SANTOS, R. A. S. et al. The ACE2/Angiotensin-(1–7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1–7). **Physiological Reviews**, v. 98, n. 1, p. 505–553, 1 jan. 2018.

SOKOLOWSKA, M. et al. Immunology of COVID-19: Mechanisms, clinical outcome, diagnostics, and perspectives - A report of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI). **Allergy**, v. 75, n. 10, p. 2445–2476, 27 out. 2020.

TAY, M. Z. et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 363–374, 28 jun. 2020.

WU, F. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265–269, 12 mar. 2020.

YE, Q.; WANG, B.; MAO, J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. **Journal of Infection**, v. 80, n. 6, p. 607–613, jun. 2020.