

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E
PARASITÁRIAS**

FABIANI DE MORAIS BATISTA

**BIOMARCADORES ASSOCIADOS A GRAVIDADE NA INFECÇÃO POR
SARS-CoV-2**

Campo Grande – MS

2023

FABIANI DE MORAIS BATISTA

**BIOMARCADORES ASSOCIADOS A GRAVIDADE NA INFECÇÃO POR
SARS-CoV-2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre, sob a orientação do Prof. Dr. Julio Henrique Rosa Croda e coorientação Dr. Marco Antonio Moreira Puga.

Campo Grande – MS

2023

Ficha catalográfica

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

FABIANI DE MORAIS BATISTA

A dissertação intitulada “BIOMARCADORES ASSOCIADOS A GRAVIDADE NA INFECÇÃO POR SARS-CoV-2”, apresentada por FABIANI DE MORAIS BATISTA, ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), como exigência parcial para obtenção do título de mestre em Doenças Infecciosas e Parasitárias, foi considerada:

APROVADA () REPROVADA () Data ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Júlio Henrique Rosa Croda - Orientador
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dra. Crhistine Cavalheiro Maymone Gonçalves
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Roberto Dias de Oliveira
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Prof.^a Dra. Karla Regina Warszawshi de Oliveira
Centro Universitário Anhanguera de Campo Grande

Prof. Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Dedico este trabalho à toda minha família e amigos. À minha equipe de trabalho do Centro de Pesquisa Clínica.

Dedico também à todas as vítimas da COVID-19: aos que sobreviveram, aos que foram a óbito, em especial aos colegas profissionais de saúde, e às famílias que sofrem.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que em mais uma etapa me cuidou em detalhes o tempo todo e permitiu a intercessão de Maria Santíssima, Ela que sempre me carrega no colo e cuida de mim como sempre cuidara de Jesus Cristo, e que me inspira na caminhada com fé e alegria.

À minha família e familiares: À minha vó Anália que sempre me apoia, caminha e vive em constante oração por todos os momentos da minha vida. À minha mãe Fátima, minha rainha e melhor amiga, que sempre está comigo na torcida, oração e apoio para o que precisar. Ao meu pai Antônio, pela presença e carinho em todas as etapas da minha vida profissional. Às minhas irmãs, sobrinhos (as) e cunhados (as) que me ajudam a superar as dificuldades com alegria, união e otimismo.

Ao meu esposo, Fernando Dantas, que, mais uma vez, se colocou à disposição para me ajudar, apoiar e orar comigo ao longo desta caminhada acadêmica e profissional.

Aos meus amigos, que me enchem de alegria, me apoiam com palavras, atos e carinhos.

Aos irmãos e irmãs de fé, que caminham comigo na igreja, e que nossa amizade e união transcende para a vida pessoal, em que partilhamos as lutas e as vitórias alcançadas.

À minha equipe de trabalho, que faz parte da minha rotina diária de estudo e valoriza a pesquisa e a ciência com todo respeito e dedicação, dando apoio e palavras de encorajamento.

À minha banca examinadora, por aceitar o convite e contribuir com tanto exímio e dedicação para a conclusão dessa etapa com sucesso e bons resultados.

À todos os profissionais que fizeram parte do estudo Multicêntrico da História Natural do Novo Coronavírus SARS-CoV-2 no Brasil (REBRACOVID), independente da função de cada um, todos foram primordiais para a conclusão desse resultado.

Ao meu orientador, prof. Dr. Julio Henrique Rosa Croda pela confiança, incentivo e dedicação para a minha formação. Com a mesma gratidão e carinho, cito o prof. Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha. São também responsáveis pelo centro de pesquisa clínica em que trabalho. Pessoas em que encontro inspiração como profissionais, pais, esposos, seres humanos, e que oferecem apoio e confiança para caminhada na minha vida profissional e acadêmica.

À Prof. Dra. Crhistine Cavalheiro Maymone Gonçalves, que fez parte de forma direta desta etapa concluída. Sempre esteve à disposição em ajudar e contribuir com muito acolhimento e carinho, independente dos novos caminhos que foram surgindo.

Ao meu co-orientador, Dr. Marco Antônio Moreira Pulga, que, desde o início, se mostrou disposto a superar os desafios para a conclusão deste trabalho, contribuindo com seus conhecimentos, dedicação e experiência profissional.

À Prof. Me. Mariana Trinidad Ribeiro da Costa Garcia Croda, que como parte da equipe de pesquisa e docente da universidade, me apoiou e contribui com atenção, carinho e disponibilidade, de maneira especial nas alterações dos projetos que se fizeram necessário durante todo esse período da minha formação.

À Prof. Dra. Inês Aparecida Tozetti, que além de me ensinar através da sua aula ministrada no PPG-DIP, também me ajudou nos primeiros passos para o aprendizado sobre o assunto principal desse trabalho, a imunologia. Sempre muito atenciosa e dedicada, contribuiu de forma direta, estando à disposição para compartilhar seus conhecimentos no meu processo de aprendizado.

Ao LPCS da UFGD, pela disponibilidade do espaço físico e equipamentos, e à toda a equipe, em especial ao Paulo Cesar Pereira dos Santos, por todo apoio, dedicação e trabalho em equipe durante as análises.

Ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias (PPG-DIP) e aos docentes por contribuírem para a minha formação.

“Nunca, jamais, desanimeis, embora venham ventos contrários.”

Santa Paulina

RESUMO

A doença por Coronavírus 2019 (COVID-19) é altamente infecciosa. Estudos documentaram a relação entre a gravidade da COVID-19 e os níveis circulantes de proteína C reativa (PCR), interleucina-6 (IL-6) e D-dímero. Em pacientes com a COVID-19 grave, foram encontrados níveis elevados de IL-6 e interleucina 2 (IL-2) e fator de necrose tumoral-Alfa (TNF- α). Outros marcadores são identificados de forma semelhante quando pacientes com COVID-19 em estado crítico apresentaram maiores níveis circulantes de IL-2, IL-7, IL-10 e TNF- α . Uma melhor compreensão das respostas imunes à infecção por SARS-CoV-2 que diferencie casos leves de graves é fundamental para uma avaliação acurada do prognóstico e identificação de futuros biomarcadores. O objetivo do estudo foi identificar diferenças nos níveis de biomarcadores sorológicos entre indivíduos com COVID-19 leve e grave. **Métodos:** Foram incluídos participantes de quatro cidades brasileiras, maiores de 18 anos, no período de outubro de 2020 a junho de 2021. Os participantes foram testados para presença de SARS-CoV-2 através da Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa Quantitativa (RT-qPCR) e, adicionalmente, tiveram uma amostra de sangue coletada para posterior análise dos biomarcadores. Os participantes foram divididos em casos índices (participantes com suspeita clínica de gripe, com até 11 dias de sintomas, com teste positivo para SARS-CoV-2, hospitalizados ou não) e contatos domiciliares de casos índices não hospitalizados (independentemente de apresentarem ou não sintomas), o que possibilitou a análise de amostras de participantes positivos assintomáticos e grupo controle negativo. A análise dos biomarcadores sorológicos foi realizada utilizando a tecnologia MAGPIX Luminex® xMAP®, usando três painéis MILLIPLEX® Map diferentes. Setenta e um biomarcadores foram quantificados de participantes com infecção por SARS-CoV-2 e grupo controle. Correlacionamos os níveis dos marcadores biológicos com os grupos controle Negativo (C), assintomático (A), não hospitalizado (leve-M) e hospitalizado (grave-S). **Resultados:** Foram incluídos 48 participantes, sendo a maioria do sexo feminino (67%), com mediana de idade de 47 anos. Dentre os biomarcadores de angiogênese, identificamos 6/17 (EGF, IL-8, HGF, HB-EGF, VEGF-C, VEGF-A) que apresentaram níveis significativamente elevados nos casos graves. Entre os biomarcadores de doenças cardiovasculares, 7/10 apresentaram diferenças significativas entre os grupos (D-dímero, GDF-15, mioglobina, sICAM-1, MPO, P-selectina e Lipocalinlipocalin-2/NGAL). Os biomarcadores D-dímero, GDF-15 e sICAM-1 estavam com os níveis mais elevados nos casos graves quando comparados com os demais grupos. Das citocinas/quimiocinas avaliadas, 9/44 apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos (IL-6, IL-7, IL-18, IP-10, M-CSF, MDC, MIP-1 beta, PDGF-AA e TNF alfa). IL-6, IP-10, M-CSF, MDC e MIP-1 beta foram maiores nos casos graves do que no grupo C. **Conclusão:** Este é o primeiro estudo compressivo no Brasil que identificou e descreveu níveis de marcadores biológicos relacionados aos níveis de citocinas, sistema cardíaco e endotelial. Pode-se observar que a maioria das alterações dos biomarcadores, quando comparados entre os grupos, apresentaram diferença estatisticamente significativa. Embora tenha sido possível encontrar alterações da maioria dos biomarcadores em participantes hospitalizados, estudos adicionais são necessários visando melhorar a associação com a evolução clínica, monitoramento e os fatores de riscos dos indivíduos com a COVID-19.

Palavras-Chave: COVID-19. SARS-CoV-2. Gravidade. Biomarcadores. Imunidade.

ABSTRACT

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is highly infectious. Studies have documented the relationship between COVID-19 severity and circulating levels of C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6) and D-dimer. In patients with severe COVID-19, elevated levels of IL-6 and interleukin 2 (IL-2) and tumor necrosis factor-Alpha (TNF- α) have been found. Other markers are similarly identified when critically ill COVID-19 patients had higher circulating levels of IL-2, IL-7, IL-10, and TNF- α . A better understanding of immune responses to SARS-CoV-2 infection that differentiate cases from levels of severity is critical for an accurate assessment of prognosis and identification of future biomarkers. The aim of the study was to identify differences in serological biomarker levels between individuals with mild and severe COVID-19. Methods: Participants from four Brazilian cities, aged over 18 years, were included from October 2020 to June 2021. Participants were tested for the presence of SARS-CoV-2 through Polymerase Chain Reaction with Quantitative Reverse Editing (RT-qPCR) and additionally had a blood sample collected for further analysis of biomarkers. Participants were divided into index cases (participants with clinical suspicion of flu, with up to 11 days of symptoms, with a positive test for SARS-CoV-2, hospitalized or not) and household contacts of non-hospitalized index cases (regardless of whether or not they had symptoms), which made it possible to analyze the selection of asymptomatic positive participants and a negative control group. Analysis of serological biomarkers was performed using MAGPIX Luminex® xMAP® technology, using three different MILLIPLEX® Map panels. Seventy-one biomarkers were quantified from participants with SARS-CoV-2 infection and control group. We correlated the levels of biological markers with negative control (C), asymptomatic (A), non-hospitalized (mild-M) and hospitalized (severe-S) groups. Results: 48 participants were included, most of them female (67%), with a median age of 47 years. Among angiogenesis biomarkers, we identified 6/17 (EGF, IL-8, HGF, HB-EGF, VEGF-C, VEGF-A) that showed significantly elevated levels in severe cases. Among cardiovascular disease biomarkers, 7/10 showed significant differences between groups (D-dimer, GDF-15, myoglobin, sICAM-1, MPO, P-selectin and Lipocalin/lipocalin-2/NGAL). The D-dimer biomarkers, GDF-15 and sICAM-1 had the highest levels in severe cases when compared to the other groups. Of the cytokine/chemokine evaluations, 9/44 showed a statistically significant difference between groups (IL-6, IL-7, IL-18, IP-10, M-CSF, MDC, MIP-1 beta, PDGF-AA and TNF alpha). IL-6, IP-10, M-CSF, MDC and MIP-1 beta were higher in severe cases than in group C. Conclusion: This is the first comprehensive study in Brazil that identified and described levels of biological markers related to levels of cytokines, cardiac and endothelial system. It can be seen that most of the changes in biomarkers, when compared between the groups, showed a statistically significant difference. Although it was possible to find changes in most biomarkers in hospitalized participants, additional studies are motivated to improve the association with clinical evolution, monitoring and risk factors of individuals with COVID-19.

Keywords: COVID-19. SARS-CoV-2. Severity. Biomarkers. Immunity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração do SARS-CoV-2 ligando-se ao receptor da ECA-2 humano e adentrando na célula do hospedeiro.....	18
Figura 2 - Nível de expressão do ECA-2 e as manifestações clínicas relacionadas a COVID-19.....	20
Figura 3 - Sequência da fisiopatologia à Infecção por SARS-CoV-2 com ilustração da resposta imunológica saudável e disfuncional.....	24
Figura 4 - Tempestade de citocinas associada a linfopenia de células T de acordo com à gravidade da COVID-19.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2019-nCoV	Doença pelo Novo Coronavírus
ALT	Alanina aminotransferase
Ang-2	Angiotensina II
AST	Aspartato aminotransferase
CID	Coagulação intravascular disseminada
COVID-19	Doença por Coronavírus 2019
CRS	Síndrome de Liberação de Citocinas
DAMPs	Padrões Moleculares Associados ao Dano
DM	Diabetes mellitus
ECA-2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática ou Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ESPIN	Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional
FKN	Fractalquina
G-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos
GM-CSF	Colônias de granulócitos-macrófagos
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HLH	Linfocitose Hemofagocítica
HLH	Linfocitose Hemofagocítica
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IFNs	Interferons
IFN- γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-18	Interleucina 18
IL-1B	Interleucina 1B
IL-2	Interleucina 2
IL-6 Amp	Amplificador IL-6
IL-6	Interleucina 6

IL-7	Interleucina 7
IL-8	Interleucina 8
IP10	Proteína 10 induzida
JHU	Universidade Johns Hopkins
LDH	Lactato desidrogenase
LHHs	Linfocitose Hemofagocítica Secundária
LTh1	Linfócitos T do tipo Helper 1
MCP-1	Proteína Quimioatraente de Monócitos-1
MERS	Síndrome Respiratória do Oriente Médio
MERS-CoV	Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio
MIP1- α	Proteína-1 Alfa Inflamatória de Macrófagos
N	Nucleocapsídeo
NF-kB	Fator nuclear kappa-light-chain-enhancer de células B ativadas
NK	Célula Natural Killer
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Cadeia da Polimerase
PCR	Proteína C Reativa
PRR	Reconhecimento Padrão
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
S	Spike
SARS-CoV	Coronavirus da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SARS-CoV-2	Coronavírus-2 da síndrome respiratória aguda grave ou Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina
SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
SUS	Sistema Único de Saúde
TC	Tomografia Computadorizada
TMPRSS2	Serina Protease Transmembrana tipo 2
TNF-beta	Fator de Necrose Tumoral Beta
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

TnI-as	Troponina I Cardíaca de alta Sensibilidade
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1
VEGF	Fator de crescimento endotelial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA	17
2.1	Novo Coronavírus	17
2.2	Características gerais da COVID-19	19
2.3	Diagnóstico da infecção pelo novo coronavírus	20
2.4	Resposta imunológica à infecção por SARS-CoV-2	21
2.4.1	Liberação de citocinas nas infecções por coronavírus	25
2.4.2	Disfunção cardiovascular e endotelial na COVID-19	27
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo Geral	30
3.2	Objetivos Específicos	30
4	RESULTADOS	31
4.1	Artigo	31
5	CONCLUSÕES	40
	REFERÊNCIAS	41
	APÊNDICE A - MATERIAL COMPLEMENTAR	49

1 INTRODUÇÃO

A Doença por Coronavírus 2019 (COVID-19) é altamente infecciosa, levando a milhares de contaminados em poucos dias. A transmissão se dá através de gotículas respiratórias, contato direto com os indivíduos infectados ou contato com objetos contaminados (LI et al., 2020b).

A patogênese viral se dá por uma maior afinidade que o SARS-CoV-2 tem pelo receptor de enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2) para entrada na célula do hospedeiro, que faz parte do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), responsável por manter o equilíbrio hidroeletrolítico e a homeostase pressórica (LI et al., 2020b; VABRET et al., 2020).

Os principais sintomas são: febre, tosse seca, fadiga, desconforto respiratório, perda do olfato e paladar (LAI et al., 2020; SUNDARAM et al., 2021). A ocorrência dos sintomas se dá pelas interações complexas, como cascatas imunológicas, inflamatórias e coagulativas. Diferentes respostas do hospedeiro ao SARS-CoV-2 desempenham um papel decisivo no que diz respeito à eliminação viral, entretanto, têm potencial para causar danos imunopatológicos ao hospedeiro (SAMPRATHI; JAYASHREE, 2020).

Acredita-se que a gravidade da COVID-19 esteja relacionada à uma resposta imunológica exacerbada com um aumento no nível de citocinas (pró-inflamatórias, pró-fibróticas e reguladoras da resposta imune), ocasionando eventos associados ao dano tecidual (QUINTI et al., 2020; TAY et al., 2020; WANG et al., 2020a) e lesão vascular (ALHAZZANI et al., 2020; GANDHI; LYNCH; DEL RIO, 2020; WANG et al., 2020a). De maneira mais específica, a tempestade de citocinas tem sido correlacionada diretamente com a lesão pulmonar. Inclusive, em numa análise pós morte de pacientes com COVID-19, autores identificaram, inflamação com infiltração de linfócitos e macrófagos no tecido pulmonar sugerindo a hiperinflamação no órgão, observando também danos alveolares com a presença de microtrombos de fibrina (FAJGENBAUM; JUNE, 2020; JOSE; MANUEL, 2020; MOLAEI et al., 2021; ONG et al., 2020; QIN et al., 2020b; ROTHAN; BYRAREDDY, 2020).

As alterações vasculares são uma das características associadas à COVID-19 (D'ONOFRIO et al., 2022; QUINTI et al., 2020), com implicações nas extremidades, sugerindo microangiopatia trombótica (LIU et al., 2020b). Fatores relacionados à coagulação também têm sido relacionados a falências de múltiplos órgãos, como

coagulação intravascular difusa e trombose de grandes vasos (PORFIDIA; POLA, 2020; TANG et al., 2020).

Estudos documentaram a relação entre a gravidade da COVID-19 e os níveis circulantes de proteína C reativa (PCR), interleucina-6 (IL-6) e D-dímero (AHNACH et al., 2020; CHEN et al., 2020b; LIU et al., 2020c; WU et al., 2020; XIE et al., 2020). Ainda em pacientes com a COVID-19 grave foram encontrados níveis elevados de IL-6 e interleucina 2 (IL-2) e fator de necrose tumoral-Alfa (TNF- α) (PONS et al., 2020). Outros marcadores são identificados de forma semelhante, quando estudos verificaram que pacientes com COVID-19 em estado crítico e internados na unidade de terapia intensiva (UTI) apresentaram maiores níveis circulantes de IL-2, IL-7, IL-10 e TNF- α (RUAN et al., 2020).

Diante disso, a compreensão da resposta imune que caracteriza a evolução dos casos, é fundamental para identificar futuros biomarcadores e desenvolver novas terapias específicas para tratamento da COVID-19. Portanto, o objetivo do presente estudo foi identificar diferenças nos níveis de biomarcadores sorológicos correlacionando com casos leve e grave da COVID-19.

2 CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA

2.1 Novo Coronavírus

Um caso de pneumonia viral grave, foi identificado, por transmissão zoonótica, na cidade de Wuhan na China em dezembro de 2019. De acordo com os dados do governo chinês, o primeiro caso de COVID-19 foi reconhecido no dia 31 de dezembro de 2019 (TAN et al., 2020). Logo em seguida, aproximadamente 700 pessoas, que entraram em contato próximo com casos suspeitos foram monitoradas e, 41 foram diagnosticadas com COVID-19 em Wuhan. A partir de meados de janeiro de 2020, ocorreram os primeiros casos confirmados fora da China continental (PAHO; WHO, 2020). Em seguida, casos confirmados nos Estados Unidos e França mostraram que a infecção disseminava-se fora do continente Asiático (WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Inicialmente foi denominado de *Doença pelo Novo Coronavírus (2019-nCoV)* e, após sequenciamento completo do RNA, foi nomeado como *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)*.

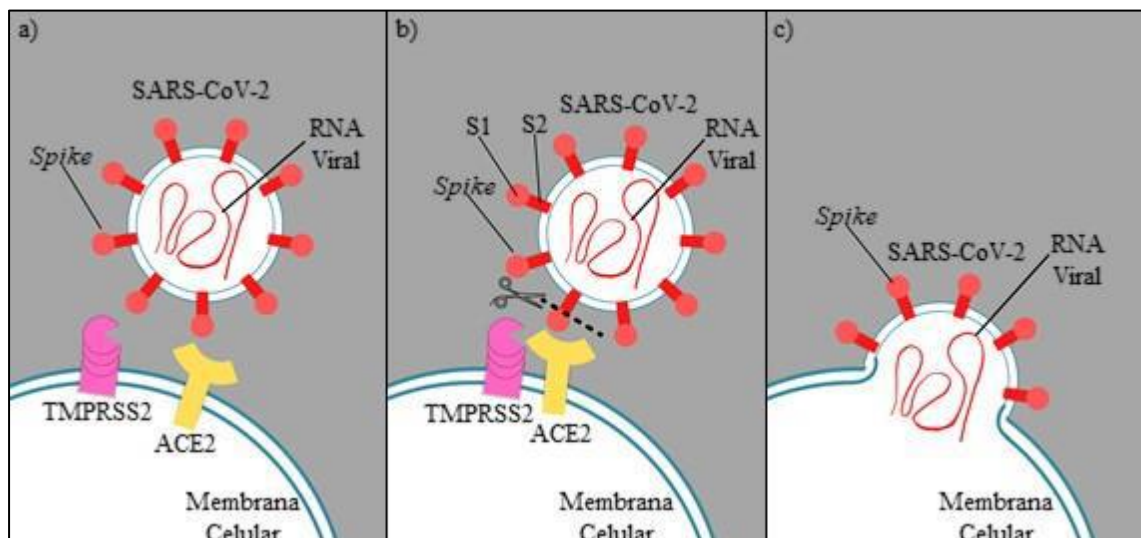
SARS-CoV-2 é o sétimo coronavírus identificado que acomete humanos. A maioria destes, inclusive o MERS-CoV, têm como ancestrais, coronavírus de morcegos, exceto o HCoV-OC43 e o HKU1, que acredita-se originar de coronavírus de roedores. SARS-CoV-2, SARS-CoV e MERS-CoV causam infecções graves e com potencial epidêmico, enquanto os outros causam infecções leves e resfriados (CUI; LI; SHI, 2019).

No que concerne à estrutura do SARS-CoV-2, é um vírus RNA, com aproximadamente 29 diferentes proteínas virais e as mais relevantes são a glicoproteína Spike (S) e a proteína N, do nucleocapsídeo viral (CERAOLO; GIORGI, 2020; GOLDSMITH et al., 2004; WIERSINGA et al., 2020). Os trímeros de proteína S dos coronavírus formam espículas em sua superfície, conferindo-lhes aparência de coroa, quando observados em microscópio eletrônico, resultando no nome “coronavírus” (HELMY et al., 2020).

Em relação a fisiopatologia, autores tem sugerido que o principal mecanismo para o vírus adentrar na célula do hospedeiro, pode ocorrer quando o SARS-CoV-2 compete com a angiotensina II e, a proteína S permite a entrada do vírus na célula hospedeira pela ligação ao receptor celular, da Enzima Conversora de Angiotensina

2 (ECA-2). A Serina Protease Transmembrana tipo 2 (TMPRSS2), atua como facilitadora para a entrada do coronavírus nas células ao clivar a S1 (HOFFMANN et al., 2020; WIERSINGA et al., 2020). A partir da TMPRSS2 é que ocorre a iniciação da proteína S do SARS-CoV-2 para sua ligação com o receptor ECA-2. A proteína S é clivada em duas subunidades, S1 e S2, pela TMPRSS2 (HOFFMANN et al., 2020; WALLS et al., 2020; WRAPP et al., 2020). Com isso, é exposto na subunidade S1 um domínio de ligação ao receptor (RBD) e na subunidade S2 é exposto outro local de clivagem (WRAPP et al., 2020). A ECA-2 interage com o domínio de ligação do receptor da subunidade S1 e a subunidade S2 facilita a fusão com a célula hospedeira a partir da ação das proteases celulares TMPRSS2 no sítio de clivagem (figura 1) (MENG et al., 2020; WRAPP et al., 2020). Em seguida o RNA genômico é liberado dentro do citoplasma da célula e tem-se início a tradução. As proteínas traduzidas passam pelo retículo endoplasmático e complexo de Golgi do próprio hospedeiro, e segue a sequência ao processo de contaminação e disseminação sistêmica (HONG et al., 2021).

Figura 1 – Ilustração do SARS-CoV-2 ligando-se ao receptor da ECA-2 humano e adentrando na célula do hospedeiro



SARS-COV-2: coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave; COVID-19: doença de coronavírus 2019; ECA-2: enzima conversora de angiotensina-2; TMPRSS2: protease transmembranar serina-2.

Fonte: Andrade, et al. Braz. Ap. Sci. Rev, Curitiba, v. 4, n. 6, p. 3792-3804 nov./dez. 2020

Essa ligação desregula o Sistema Renina-Angiotensina Aldosterona (SRAA), aumentando a disponibilidade de angiotensina II e consequentemente favorecendo eventos pró-inflamatórios e pró-fibróticos. Esse mecanismo também faz com que

ocorra o bloqueio da atividade da ECA-2, diminuindo sua disponibilidade e conseqüentemente desencadeando um desequilíbrio no organismo, desenvolvendo os efeitos de vasoconstrição, inflamação, e aumento do estresse oxidativo (BEYERSTEDT; CASARO; RANGEL, 2021; LU; SUN, 2020).

2.2 Características gerais da COVID-19

A Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu como COVID-19 a doença causada pelo vírus SARS-CoV-2.

Após a infecção, o indivíduo leva em média de 5-6 dias para o início de sintomas (LI et al., 2020a; WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020), no entanto, estudos demonstraram que o período de incubação pode durar até 14 dias (LI et al., 2020a).

Os sintomas mais comuns relatados na literatura até agora incluem febre, tosse, fadiga e falta de ar (GUAN et al., 2020). Os sintomas menos comuns incluem náusea ou vômito, cefaleia, dor de garganta e rinorréia (HUANG et al., 2020). Distúrbios do olfato e paladar, como anosmia e disgeusia, são relatados, porém não considerados característica peculiar da doença (CASCELLA et al., 2022; ZHOU et al., 2020). Pneumonia representa a manifestação clínica mais séria da infecção, caracterizada por febre, tosse, dispneia e infiltrados pulmonares presentes bilateralmente aos exames de imagens (GRASSELLI; PESENTI; CECCONI, 2020).

O elevado risco para desenvolver a forma grave da doença se dá em pessoas com idade igual ou superior a 60 anos e com condições médicas preexistentes (WU; MCGOOGAN, 2020). Estes indivíduos tem o percentual de hospitalização seis vezes maior quando comparados com aqueles sem doenças pré-existentes (45,4% *versus*. 7,6%) (STOKES et al., 2020).

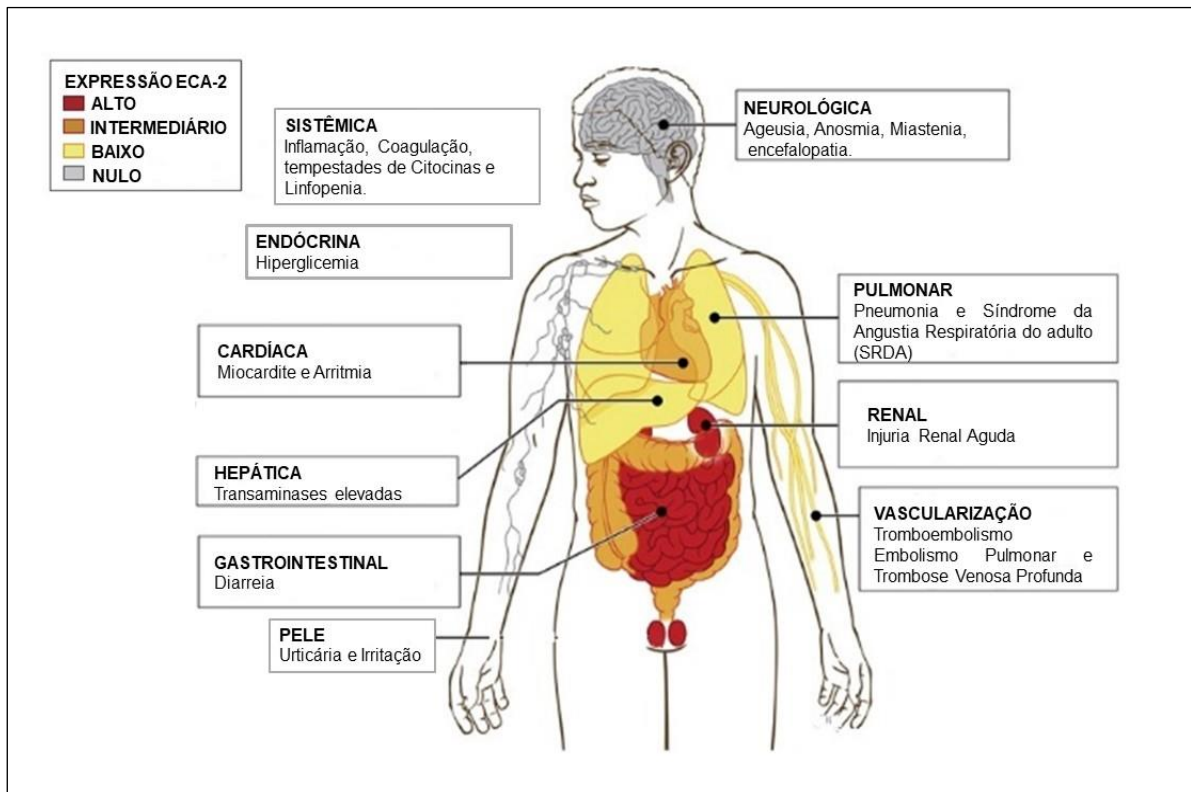
Os danos causados aos pulmões, hipóxia e desconforto respiratório, acredita ser em consequência da fase inflamatória inicial, edema pulmonar e uma resposta imune exacerbada durante a infecção (WANG et al., 2020a). A doença pode progredir para distúrbios respiratórios e falência de múltiplos órgãos, o que caracteriza casos graves com grande possibilidade de evoluir para óbito (ALHAZZANI et al., 2020)

Outro fator associado a gravidade da COVID-19, segundo Pathangey et al. (2020), está relacionado ao tropismo direto do SARS-CoV-2 sobre os receptores ECA-2, que uma vez distribuído em vários tecidos, podendo ter alta expressão, leva a lesão

em múltiplos órgãos nobres como o coração, rins e tecido hepático, além de efeitos no sistema gastrointestinal. (HARISHA et al., 2022; HU; HUANG; YIN, 2021; PATHANGEY et al., 2021; SSENTONGO et al., 2020; XU et al., 2020a). (Figura 2)

Figura 2 – Nível de expressão do ECA-2 e as manifestações clínicas relacionadas a COVID-

19



Fonte: Adaptado de Asselah T, et al. COVID-19: Descoberta, diagnóstico e desenvolvimento de medicamentos. *J Hepatol*. 2021;74(1):168-184 e Pathangey G, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 and COVID-19: patients, comorbidities, and therapies. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2021 Mar 1;320(3):L301-L330.

2.3 Diagnóstico da infecção pelo novo coronavírus

O diagnóstico da SARS-CoV-2 é realizado através de testes que identificam o ácido ribonucleico do vírus ou a presença de anticorpos, podendo adicionalmente para critério clínico usando exame de imagem, como tomografia computadorizada. O tipo de diagnóstico vai de acordo com a necessidade, uma vez que, se faz necessário considerar o tempo de sintomas do paciente. O vírus pode ser detectado do primeiro ou, a partir do terceiro dia até 14 dias de sintomas, dependendo do método diagnóstico utilizado. O Padrão ouro para o diagnóstico do SARS-CoV-2 é a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR), através de material biológico

da nasofaringe, que detecta o ácido ribonucleico (RNA) viral. Apesar da alta sensibilidade e especificidade, o ensaio RT-qPCR têm como desvantagens alto custo, demanda equipe qualificada e tempo de 4 a 6 horas para ser concluído, além disso após 14 dias da infecção, o RNA viral é praticamente indetectável (ASSELAH et al., 2021; RAI et al., 2021).

Os testes sorológicos são mais acessíveis quando comparados ao RT-qPCR. A técnica baseia-se no ensaio de imunoabsorção enzimática, o *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA). Apesar de serem mais utilizados para fins epidemiológicos, devido a resposta imunológica tardia da produção de anticorpo, esses testes podem identificar anticorpos (IgM e IgG) utilizando amostras biológicas. A IgM pode ser detectada a partir do 3º até o 6º dia após o início da infecção, o IgG é detectado no final da fase da infecção (14 dias após início dos sintomas), ou ainda em casos assintomáticos (ASSELAH et al., 2021; LONG et al., 2020; RAI et al., 2021).

O teste de detecção de antígeno é um teste imunocromatográfico e entrou no mercado para suprir a necessidade de ter métodos alternativos mais baratos e rápidos considerando a emergência de saúde do novo coronavírus. Sendo realizado de amostras de swab nasofaríngeo, detecta a presença do antígeno ainda no início da infecção (FILCHAKOVA et al., 2022).

O acompanhamento clínico durante a infecção pelo SARS-CoV-2 também é possível por técnicas de imagem, sendo a mais comum a Tomografia Computadorizada (TC) de tórax, em que opacidades em vidro fosco bilaterais e periféricas e opacidades pulmonares consolidadas são os padrões mais comuns com a pneumonia associada a COVID-19 (BERNHEIM et al., 2020; RAI et al., 2021). De acordo com Zhao et al, além dessas características, o aumento vascular na lesão e a bronquiectasia de tração são outras características das tomografias computadorizadas de SARS-CoV-2 (ZHAO et al., 2020). A TC tem como benefício a rapidez do procedimento e ser eficaz na observação da progressão, regressão da infecção, e recuperação total do SARS-CoV-2 (WANG et al., 2020c).

2.4 Resposta imunológica à infecção por SARS-CoV-2

A resposta imunológica ao SARS-CoV-2 se faz comum no início da infecção como em outras infecções virais, nas quais a resposta é mediada por reações da imunidade inata e da adaptativa. Células dendríticas, macrófagos e neutrófilos como

primeira linha de defesa, iniciam a reação imune e afetam seu tipo e intensidade (BARTON et al., 2020).

Para a eliminação das partículas virais se faz necessário uma produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α), responsáveis pela ativação neutrófila. Esta resposta imunológica induz atividade fagocítica dos macrófagos, com destruição do patógeno e aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias, pró-fibróticas e regulatórias da resposta imune (MARQUES et al., 2016; MCGONAGLE et al., 2020; MEHTA et al., 2020).

São ativadas também células como os linfócitos T do tipo helper 1 (LTh1), que secretam citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, e estimuladoras de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), aumentando a expressão de mais células, como os linfócitos T CD4+, CD16+ e monócitos, para produzir maiores quantidades de IL-6, TNF- α e demais citocinas, intensificando a resposta inflamatória (HU; HUANG; YIN, 2021).

A replicação ativa e a liberação do vírus fazem com que a célula hospedeira sofra piroptose e libere padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), incluindo ATP, ácidos nucleicos e oligômeros ASC. O processo de uma resposta imunológica conta com a participação dos IFNs tipo 1, que desempenham um papel importante na inibição do estágio inicial da infecção por COVID-19. Células dendríticas e macrófagos mononucleares, reconhecem antígenos virais e induzem uma resposta de fase aguda por meio de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 e TNF- α , IL-6, IP-10, proteína inflamatória de macrófagos 1 α (MIP1 α), MIP1 β e MCP1. Essas proteínas atraem monócitos, macrófagos e células T para o local da infecção, promovendo mais inflamação (com a adição de IFN γ produzido pelas células T) e estabelecendo um ciclo de feedback pró-inflamatório (KIM et al., 2021; TAY et al., 2020).

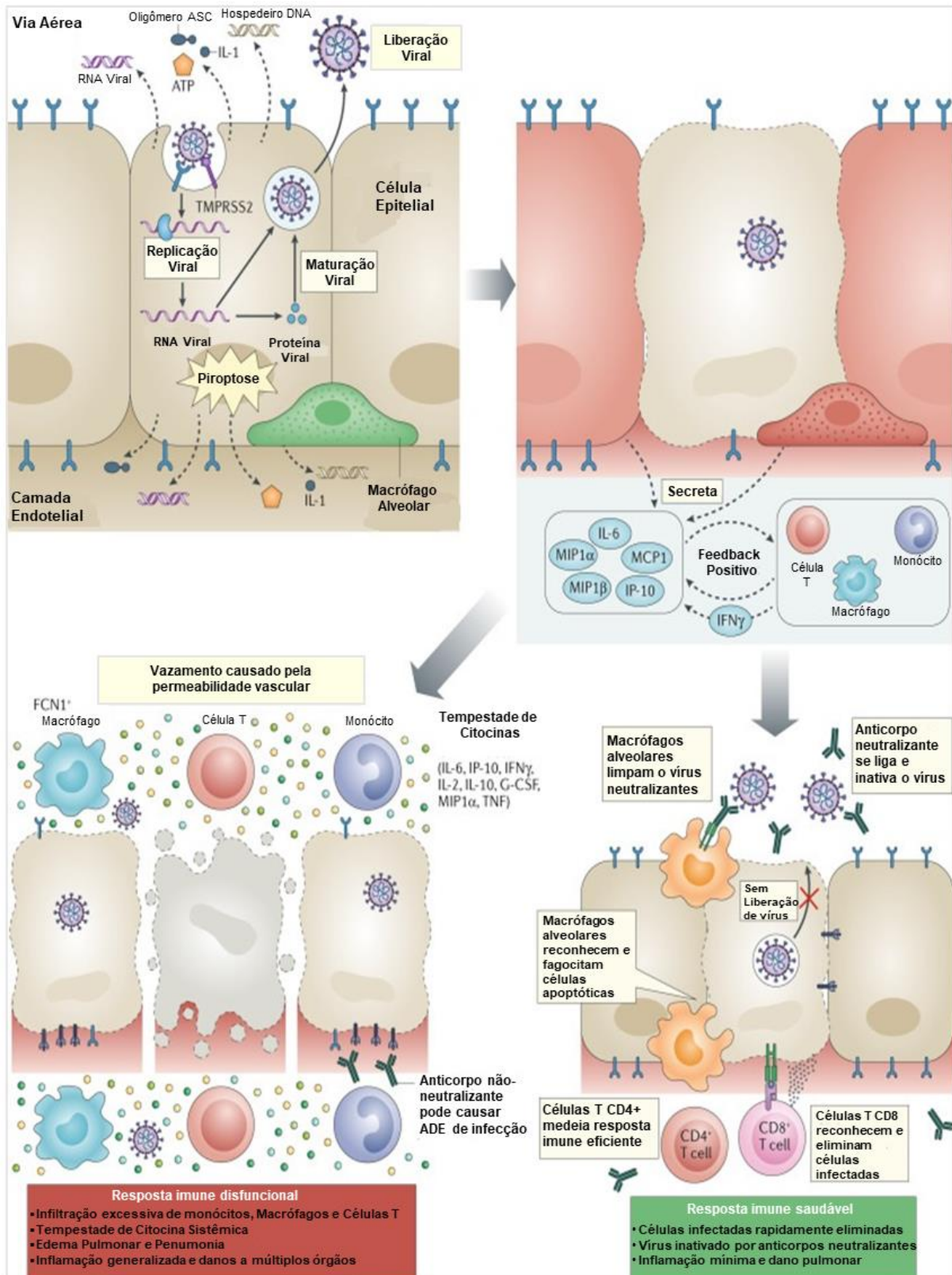
Considerando uma resposta imune saudável, a inflamação inicial atrai as células T específicas para o local da infecção, onde podem eliminar as células infectadas antes que o vírus se espalhe. Anticorpos neutralizantes nesses indivíduos podem bloquear a infecção viral e, macrófagos alveolares reconhecem vírus neutralizados e células apoptóticas e os eliminam por fagocitose. Juntos, esses processos levam à eliminação do vírus e danos mínimos aos pulmões, resultando em recuperação. Nos casos que ocorre falha na resposta imune, há um acúmulo, além do necessário, de células imunes nos pulmões, causando superprodução de citocinas pró-inflamatórias, que eventualmente danificam a infraestrutura pulmonar (TAY et al.,

2020). Um estudo identificou, após autópsias de pacientes que morreram de COVID-19, uma alta infiltração de macrófagos na área da broncopneumonia (BARTON et al., 2020). Como resultado à tempestade de citocinas, estas circulam para outros tecidos, levando a danos em vários órgãos. Além disso, os anticorpos não neutralizantes produzidos pelas células B podem aumentar a infecção por SARS-CoV-2 por meio do aprimoramento dependente de anticorpos (ADE), exacerbando ainda mais os danos aos órgãos (Figura 3) (TAY et al., 2020).

Nos casos críticos ocorre a síndrome de inflamação pulmonar e extrapulmonar, chamada de Linfocitose Hemofagocítica Secundária (LHHs). A LHHs caracteriza-se por hiperativação imunológica devido à eliminação inadequada de macrófagos ativados pelas células natural killer (NK) e pelos linfócitos T citotóxicos, o que resulta, em produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias (WANG et al., 2020a)

Essas respostas inflamatórias descontroladas podem levar a anormalidades imunológicas, caracterizadas por linfopenia, disfunção de linfócitos e anormalidades de granulócitos e monócitos, que podem resultar em choque séptico e disfunção de múltiplos órgãos, especialmente dos sistemas cardíaco, hepático, renal, vascular e imunológico, evoluindo para óbito (BEECHING et al., 2020; WANG et al., 2020a; YANG et al., 2020; ZHANG; SUN; FENG, 2020).

Figura 3 - Sequência da fisiopatologia à Infecção por SARS-CoV-2 com ilustração da resposta imunológica saudável e disfuncional.



G-CSF: Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos; TNF, Fator de Necrose Tumoral
 Fonte: Adaptado de Tay, et al., 2020.

2.4.1 Liberação de citocinas nas infecções por coronavírus

Pouco se sabe sobre os determinantes que causam a gravidade da doença e a desregulação imunológica na infecção por SARS-CoV-2 em humanos. O estudo de Chen et al. fornece evidências que possibilita identificar a desregulação imunológica entre 7 a 10 dias após início da infecção, quando aumenta a tempestade de citocinas e o desconforto respiratório atinge a gravidade (CHEN et al., 2020a).

Citocinas e quimiocinas têm apresentado um papel importante na imunidade e imunopatologia, mas respostas imunes desreguladas e exacerbadas demonstraram ser capazes de causar danos pulmonares e diminuição da sobrevivência (DIAO et al., 2020). Alta expressão de citocinas como IL-1B, IFN-gama, MCP-1 foi detectada em pacientes com COVID-19 (YE; WANG; MAO, 2020). Estudo sugere um aumento significativo de citocinas e quimiocinas inflamatórias, incluindo interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 β (IL-1 β), proteína 10 induzidas (IP10) e proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) em pacientes graves, quando comparados com casos leves (YAO et al., 2020). Além dessas, outros biomarcadores estão elevados entre pacientes em tratamento de terapia intensiva, como as IL-2, IL-7, IL-10, G-CSF, MIP1- α e TNF- α relatadas por (HUANG et al., 2020).

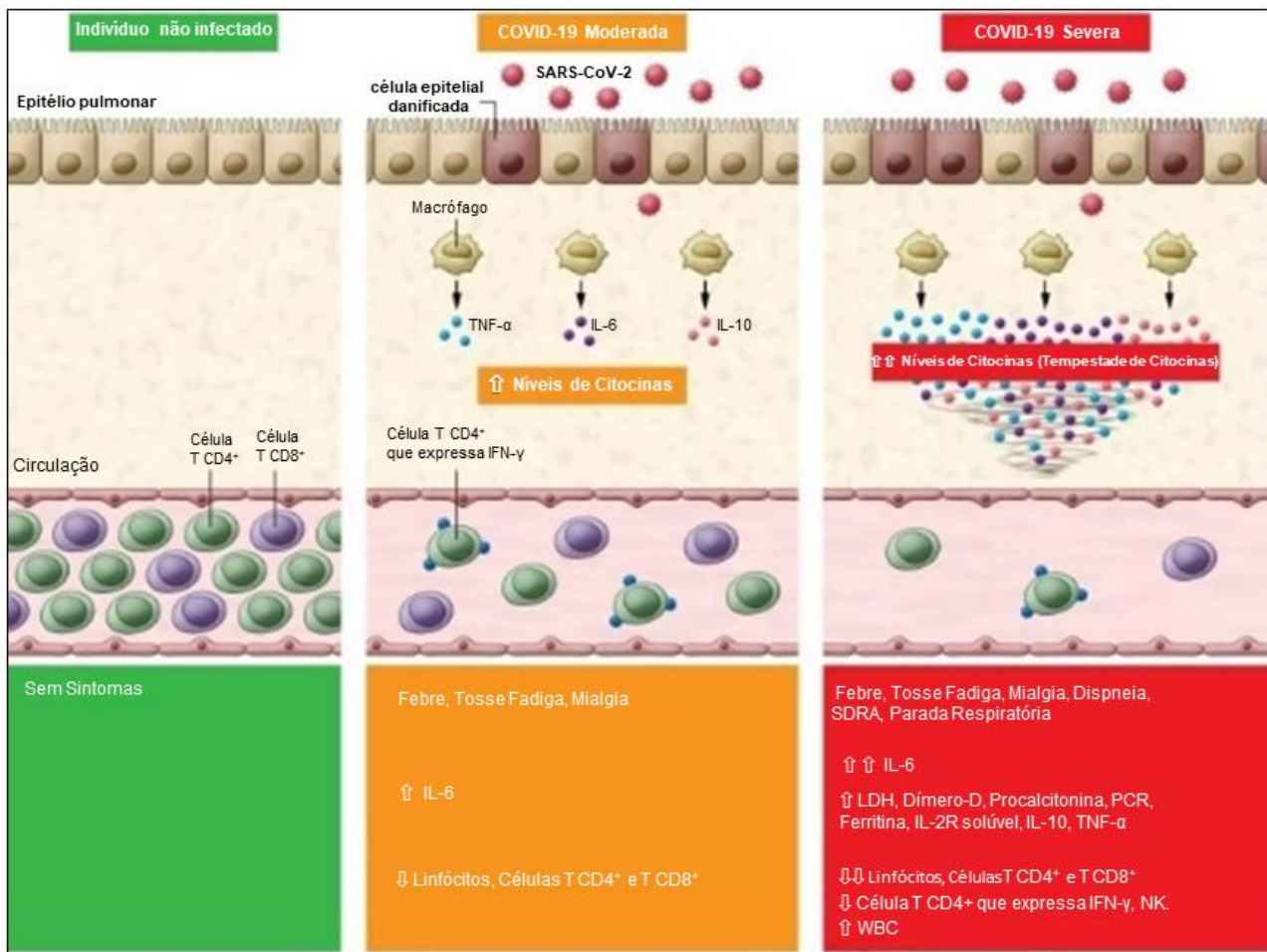
Assim também, marcadores hepáticos (aspartato e amino transferases – AST e ALT), lactato desidrogenase (LDH), proteína C reativa (PCR), ferritina, D-dímero e citocinas (IL-2R, IL-6, IL-10 e TNF- α) estavam mais elevados nos casos graves da COVID-19 quando comparado com casos moderados (CHEN et al., 2020a). O estudo de Liu e colaboradores, verificou o aumento de níveis de IL-6, IL-10, IL-2 e IFN-gama no sangue periférico de pacientes com casos graves da COVID-19, e após acompanhamento, à medida que esses recuperavam gradualmente da doença os níveis de citocinas foram diminuindo assemelhando-se aos casos leves (LIU et al., 2020a). Outros autores revelaram ainda que, à medida que a gravidade da doença progride, os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias também aumentam (SHI et al., 2020).

A Síndrome de Liberação de Citocinas (CRS) pode desempenhar um papel importante na COVID-19 grave (FELSENSTEIN et al., 2020; MOORE; JUNE, 2020; TAY et al., 2020; YAO et al., 2020). A CRS refere-se a uma liberação descontrolada de mediadores pró-inflamatórios quando o sistema imunológico fica excessivamente ativado (LEE et al., 2014). Inclusive manifestações da COVID-19 extrapulmonar, ou

seja, em outros órgãos podem estar relacionados a liberação exacerbada de citocinas em outros órgãos, uma vez que pacientes sem sinais de insuficiência respiratória apresentam alterações nas enzimas hepáticas e creatinina sérica, correlacionando a tempestades de citocinas como um fator de prognóstico para a gravidade da COVID-19 (YE; WANG; MAO, 2020). Estudo relata que a tempestade de citocinas é o resultado de uma falha do sistema imunológico em conter o vírus, que inicialmente ocorre uma deficiência imunológica temporário e segue para o estágio em que o sistema imunológico fica hiperativo para compensar a falha, tendo como manifestação clínica a própria tempestade de citocinas, indicando que na COVID-19 a liberação exacerbada de citocinas ocorre no estágio posterior da doença (KIM et al., 2021; MCGONAGLE et al., 2020). Estudos ainda mostram que nos pacientes críticos com COVID-19, as respostas imunológicas desreguladas estão relacionadas a uma linfopenia grave com células T pró-inflamatórias hiperativadas (XU et al., 2020b) e células T reguladoras reduzidas (QIN et al., 2020a).

Na figura 4 é possível observar, através do estudo de Pedersen et al.,2020, uma comparação de indivíduos não infectados com os casos moderados da COVID-19, em que ocorre um aumento na IL-6 e uma diminuição na contagem total de linfócitos T, particularmente células T CD4+ e células T CD8+. Nos casos graves a produção de IL-6, IL-2R, IL-10 e TNF- α aumentaram ainda mais, enquanto linfócitos T totais, particularmente células T CD4+ e células T CD8+ e CD4 que expressam IFN- γ diminuem acentuadamente. O nível de tempestade de citocinas e linfopenia de células T está associado a dano pulmonar, dificuldade respiratória e resultado desfavorável (PEDERSEN; HO, 2020).

Figura 4 – Tempestade de citocinas associada a linfopenia de células T de acordo com a gravidade da COVID-19.



SDRA, síndrome do desconforto respiratório agudo; PCR, Proteína C reativa; LDH, Lactato Desidrogenase.

Fonte: Adaptado de Pedersen, et al., 2020.

2.4.2 Disfunção cardiovascular e endotelial na COVID-19

A COVID-19 tem manifestações clínicas predominante com comprometimento do sistema respiratório. Contudo, como já visto, a forma grave é caracterizada por uma resposta imunológica intensa que, além de causar disfunção pulmonar, provoca a infecção em múltiplos órgãos, tendo como repercussões as lesões no sistema cardiovascular e endotelial (YE; WANG; MAO, 2020; ZHANG; SUN; FENG, 2020). Além disso, estudos também associam uma maior gravidade entre os pacientes que tem doença cardíaca prévia, inclusive em outros tipos de infecções virais e gripais (CORRALES-MEDINA et al., 2013; UDELL et al., 2013).

No caso do SARS-CoV-2, uma potencial possibilidade de relação direta do vírus com a função cardíaca, se dá pelo fato de a Enzima Conversora de Angiotensina

2, o receptor para SARS-CoV-2, ser expressa em miócitos e células endoteliais vasculares (GALLAGHER; FERRARIO; TALLANT, 2008; MENDOZA-TORRES et al., 2015).

A avaliação de marcadores sorológicos de doença cardíaca, angiogênese e fator de crescimento, tem fundamental importância para o monitoramento da gravidade da COVID-19 associadas a lesões cardíacas e vasculares, que contribuem para um prognóstico desfavorável, podendo causar óbito (FLEURY, 2020; MARTINS-FILHO; BARRETO-FILHO; SANTOS, 2020).

O aumento da Troponina I Cardíaca de alta Sensibilidade (TnI-as) é relatado em mais de 50% dos pacientes que foram internados por complicações da COVID-19 e morreram. O D-dímero, quando maior que 1 µg/mL também foi associado ao desfecho fatal (ZHOU et al., 2020). D-dímero representa a ativação dos sistemas de coagulação e fibrinólise, e a formação se dá pela degradação de fibrina (GAFFNEY, 1980).

A atividade de coagulação alterada, com o aumento das concentrações de D-Dímero, estão presentes em cerca de 90% dos pacientes internados por pneumonia (MILBRANDT et al., 2009), e tem associação com a mortalidade de pacientes com infecção ou sepse (RODELO et al., 2012). O dímero D também é determinado como um dos critérios diagnósticos da coagulação intravascular disseminada (CID) e é utilizado para a vigilância de possíveis eventos trombóticos, como trombose venosa profunda ou embolia pulmonar (CUI et al., 2020).

Diversos mecanismos estão sendo estudados para melhor compreensão das alterações cardiovasculares que ocorrem na COVID-19. Estudos realizados nos casos de pneumonias por outras infecções respiratórias, têm feito os pesquisadores considerarem que há respostas sistêmicas de citocinas pró-inflamatórias, que são mediadores da aterosclerose e contribuem diretamente para a ruptura da placa por meio de inflamação local, indução de fatores pró-coagulantes e alterações hemodinâmicas, que predispõem a isquemia e trombose (CORRALES-MEDINA et al., 2013; DAVIDSON; WARREN-GASH, 2019).

Na COVID-19 tem sido proposto lesão cardíaca por invasão direta de cardiomiócitos, e subsequente miocardite, ou também lesões relacionadas às consequências sistêmicas da doença (DENG et al., 2020; TAVAZZI et al., 2020).

Outra resposta à COVID-19 é agressão direta viral ou imunomediada ao endotélio (BANSAL, 2020; BERMEJO-MARTIN et al., 2020; GUAN et al., 2020;

GUPTA et al., 2020; SWIRSKI, 2018). O endotélio é um órgão ativo indispensável para a regulação dos tônus e a manutenção da homeostase vascular. Estudos histológicos *post mortem* revelaram um quadro de endotelite linfocítica nos pulmões, coração, rins e fígado, bem como necrose celular e presença de microtrombos que, nos pulmões, piora a insuficiência respiratória (ACKERMANN et al., 2020; VARGA et al., 2020; WANG et al., 2020b). Sendo assim, a disfunção endotelial causada pelo SARS-CoV-2 pode justificar por que pacientes com doenças vasculares preexistentes têm maior risco de desenvolver a COVID-19 grave (BANSAL, 2020; GANDHI; LYNCH; DEL RIO, 2020).

Os mecanismos de distúrbio da coagulação ainda são complexos, contudo é possível afirmar que fatores como a endoteliopatia e a ativação plaquetária podem ser importantes (GOSHUA et al., 2020). O fibrinogênio, que é conhecido como uma das proteínas de fase aguda, é sintetizado em grande quantidade pelo fígado em resposta à ativação pela IL-1 e IL-6, além de estar envolvido na formação de fibrina como última etapa de uma coagulação (LEVI et al., 2009).

A inflamação vascular aguda e o recrutamento de células T perivasculares, leva à ruptura da barreira alvéolo-capilar e aumento da permeabilidade, provocando uma disfunção endotelial. As células endoteliais circundadas por linfócitos T apresentam características de forte ativação, referidas como “endotelite”, o que leva o paciente a desenvolver trombose, vasoconstrição e angiogênese intussusceptiva distinta (ACKERMANN et al., 2020; HUERTAS et al., 2020). Existem biomarcadores que auxiliam na regulação da Barreira Endotelial (BE), como as vias da angiopoietina (Ang) 1 e 2 e seu receptor Tie2, e a via do VEGF-A/VE-caderina (VEC) (CUI et al., 2020). Estudo de avaliação de moléculas de adesão de células endoteliais em pacientes com COVID-19, observou elevação da fractalquina (FKN), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) (TONG et al., 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar diferenças nos níveis de biomarcadores sorológicos entre indivíduos com COVID-19 leve e grave.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar níveis sérico de citocinas, marcadores cardiovasculares e angiogêneses em casos leves e graves da COVID-19 e controles negativos;
- Caracterizar as principais diferenças no que diz respeito a citocinas, marcadores cardiovasculares e angiogêneses entre casos leves e graves da COVID-19 e controles negativos.

4 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados na modalidade de artigo. Artigo: “Serum Biomarkers Associated with SARS-CoV-2 Severity”

4.1 Artigo

Revista de publicação: Scientific Report - Nature

Fator de impacto de 2 anos (2021): 4,996

Qualis vigente 2017-2020: A1

DOI: 10.1038/s41598-022-20062-5

www.nature.com/scientificreports

scientific reports

OPEN

Serum biomarkers associated with SARS-CoV-2 severity

Fabiani de Moraes Batista^{1,2,3}, Marco Antonio Moreira Puga^{1,2,3}, Patricia Vieira da Silva¹, Roberto Oliveira³, Paulo Cesar Pereira dos Santos³, Bruna Oliveira da Silva³, Mariana Bento Tatará³, Daniel Henrique Tsuha⁴, Maria Aparecida dos Santos Pires^{5,6}, Crhistinne Cavalheiro Maymone Gonçalves¹, Rômulo Pessoa e Silva⁷, Nathália Tavares Ferreira⁷, Amanda Pinheiro de Barros Albuquerque⁷, Giselle da Silva Duarte⁸, Márcia Edilaine Lopes Consolaro^{9,10}, Fabio Juliano Negrão^{5,6}, Idalina Cristina Ferrari³, Luciano Pamplona de Goes Cavalcanti^{11,12,13}, Karen Soares Trinta¹⁴, Guilherme S. Ribeiro^{15,16}, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo⁷, Rosemary J. Boyton^{17,18}, André Machado Siqueira¹⁹, Daniel M. Altmann²⁰ & Julio Croda^{1,2,3,21}✉

Immunity with SARS-CoV-2 infection during the acute phase is not sufficiently well understood to differentiate mild from severe cases and identify prognostic markers. We evaluated the immune response profile using a total of 71 biomarkers in sera from patients with SARS-CoV-2 infection, confirmed by RT-PCR and controls. We correlated biological marker levels with negative control (C) asymptomatic (A), nonhospitalized (mild cases-M), and hospitalized (severe cases-S) groups. Among angiogenesis markers, we identified biomarkers that were more frequently elevated in severe cases when compared to the other groups (C, A, and M). Among cardiovascular diseases, there were biomarkers with differences between the groups, with D-dimer, GDF-15, and sICAM-1 higher in the S group. The levels of the biomarkers Myoglobin and P-Selectin were lower among patients in group M compared to those in groups S and A. Important differences in cytokines and chemokines according to the clinical course were identified. Severe cases presented altered levels when compared to group C. This study helps to characterize biological markers related to angiogenesis, growth factors, heart disease, and cytokine/chemokine production in individuals infected with SARS-CoV-2, offering prognostic signatures and a basis for understanding the biological factors in disease severity.

COVID-19 has a broad spectrum of clinical manifestations. Studies estimate that 30 to 60% of COVID-19 cases are asymptomatic or mildly symptomatic, and 5% of symptomatic cases are seriously ill¹, which is a reflection of complex interactions, including immunological, inflammatory, and coagulative cascades².

¹School of Medicine, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil. ²Associated Prof. Nursing Course, State University of Mato Grosso do Sul, Dourados, MS, Brazil. ³Laboratory of Research in Health Science, Faculty of Health Science, Federal University of Grande Dourados, Dourados, Brazil. ⁴State Health Department of Mato Grosso do Sul, Center for Strategic Information in Health Surveillance, Campo Grande, Brazil. ⁵Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. ⁶University Hospital of Federal University of Grande Dourados, Federal University of Grande Dourados, Dourados, Brazil. ⁷Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife, Brazil. ⁸Laboratory in Clinical Research of Acute Febrile Illnesses, National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil. ⁹Postgraduate Program in Biosciences and Pathophysiology, State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil. ¹⁰Regional University Hospital of Maringá, State University of Maringá, Maringá, Brazil. ¹¹Postgraduate Program in Public Health, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil. ¹²School of Medicine, Christus University Center, Fortaleza, Brazil. ¹³Postgraduate Program in Pathology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil. ¹⁴Laboratory of Diagnostic Technology, Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil. ¹⁵Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil. ¹⁶School of Medicine, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil. ¹⁷Department of Infectious Disease, Imperial College London, London, UK. ¹⁸Lung Division, Royal Brompton and Harefield Hospitals, London, UK. ¹⁹National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil. ²⁰Department of Immunology and Inflammation, Imperial College London, London, UK. ²¹Fiocruz Mato Grosso do Sul, Oswaldo Cruz Foundation, Campo Grande, Brazil. ✉These authors contributed equally: Fabiani de Moraes Batista and Marco Antonio Moreira Puga. ✉email: julio.croda@fiocruz.br

Variables	Controls-C N=9	Asymptomatic-A N=14	Mild Cases-M N=13	Severe Cases-S N=12	p-value
Gender					
Female	4 (44.4%)	10 (71.4%)	11 (84.6%)	7 (58.3%)	0.234*
Male	5 (55.6%)	4 (28.6%)	2 (15.4%)	5 (41.7%)	
Age y					
Median (IQR)	43 (32.0–49.0)	49.5 (21.50–54.25)	40 (33.0–44.0)	62.5 (58.5–66.5)	0.005 ^b
Ethnicity					
White	1 (11.1%)	6 (42.9%)	4 (30.8%)	10 (83.3%)	0.010*
Black	8 (88.9%)	7 (50.0%)	7 (53.8%)	2 (16.7%)	
Others	0 (0.0%)	1 (7.1%)	2 (15.4%)	0 (0.0%)	

Table 1. Sociodemographic characteristics according to clinical outcome in individuals with SARS-CoV-2 infection and negative controls (n = 48). y years; IQR Interquartile Range; Mild Cases-M: Non-hospitalized; Severe cases-S: Hospitalized. * Fisher's exact test. ^b Kruskal–Wallis test.

Differences in host responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) play a decisive role in COVID-19 with respect to differential clearance of viral infection but also have the potential for immunopathological damage to the host². Immunological dysregulation and an increase in the level of cytokines (proinflammatory, profibrotic, and regulatory of the immune response) are responsible for tissue damage^{3–5}.

Vascular alterations are other characteristics associated with COVID-19^{3,6} with changes in the extremities, suggesting thrombotic microangiopathy⁷. Coagulation-related factors have also been associated with multisystem organ failures, such as diffuse intravascular coagulation and large-vessel thrombosis^{4,9}.

The severity of COVID-19 appears to be related to an exacerbated immune response and events associated with vascular injury^{3,5,10,11}. Several studies have documented the association between COVID-19 severity and circulating levels of C-reactive protein (CRP), interleukin-6, and D-dimer^{12–16}. A better understanding of the broad spectrum of immune responses that differentiate mild from severe cases is critical for identifying future biomarkers and developing new, specific therapies for COVID-19. Also, it is important to understand if the variation in immunological response against the infection differs among populations with distinct genetic profile. In this the first study in Brazil, we evaluated three panels (Angiogenesis and growth factor, Cardiovascular Diseases, Cytokines/Chemokines) giving a total of 71 biomarkers in sera from asymptomatic, mild and severe COVID-19 patients.

Results

From individuals eligible according to the selection criteria, we selected 48 participants using non-probability sampling, for convenience, divided into four groups: 9 Negative Control (C), 14 Asymptomatic (A), 13 Non-hospitalized (Mild Cases-M), and 12 Hospitalized (Severe cases-S) (of these, five were admitted to the Intensive Care Unit and one died).

The majority were female (67%), had a median age of 47 years and 50% to the black ethnic group. (Table 1). The most common signs and symptoms were headache, fever, runny nose, cough, anosmia, and dysgeusia (Table 2).

We sequenced 12/48 samples, and the variants were identified as nine Zeta (P2), 2 Gamma Subvariant (P.1.7 and 1 N.9) and one B.1.1.

Cytokines/chemokines. Of the 44 cytokines/chemokines evaluated, 9 showed a statistically significant difference between the groups (IL-6, IL-7, IL-18, IP-10, M-CSF, MDC, MIP-1 beta, PDGF-AA and TNF alpha). This study identified important differences in cytokines and chemokines according to clinical evaluation: IL-6, IP-10, M-CSF, MDC and MIP-1 beta were higher in severe cases than in the C group. MDC biomarkers from hospitalized participants presented at a lower level compared to the control group. When comparing C with A, there were lower levels of PDGF-AA in the A group. The M group had lower levels of MDC and higher levels of IP-10 than the C group (Fig. 1).

Cardiovascular disease markers. Among the 10 cardiovascular disease markers tested, 7 showed significant differences between groups (D-dimer, GDF-15, myoglobin, sICAM-1, MPO, P-selectin and lipocalin-2/NGAL). This study identified differences in biomarkers according to the clinical disease outcome: D-dimer, and sICAM-1 biomarkers from severe case group participants were the highest. Myoglobin and P-selectin biomarkers from M were the lowest compared with S and A. There was no difference between biomarkers from C and A (Fig. 2).

Angiogenesis and growth factor markers. Among the 17 angiogenesis markers evaluated, we identified 6 that showed significantly different levels between groups (BFGF, IL-8, HGF, HB-EGF, VEGF-C, VEGF-A), always with higher levels of these biomarkers in the most severe group that progressed to hospitalization compared to the others (C, A and M). The EGF biomarker from mild cases was the lowest compared to the S, A, and C groups ($p < 0.05$). Comparing A to C, there was a significant difference for VEGF-C ($p < 0.05$). The VEGF-C biomarker from C was the lowest (Fig. 3).

Variables	Controls-C N=9	Asymptomatic-A N=14	Mild cases-M N=13	Severe cases-S N=12	p-value
Fever					
Yes	0 (0.0%)	0 (0.0%)	8 (61.5%)	7 (58.3%)	<0.001*
Median (IQR) ^a	0 (0-0)	0 (0-0)	3 (0-4.0)	3.5 (0-5.5)	<0.001 ^b
Cough					
Yes	0 (0.0%)	0 (0.0%)	7 (53.8%)	9 (75.0%)	<0.001*
Median (IQR) ^a	0 (0-0)	0 (0-0)	3 (0-6.0)	3.5 (2.25-5.0)	<0.001 ^b
Sore throat					
Yes	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (15.4%)	5 (41.7%)	0.009*
Median (IQR) ^a	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-5.0)	0.014 ^b
Nasal congestion					
Yes	0 (0.0%)	0 (0.0%)	9 (69.2%)	7 (58.3%)	<0.001*
Median (IQR) ^a	0 (0-0)	0 (0-0)	4 (0-7.0)	3.5 (0-5.0)	<0.001 ^b
Dyspnea					
Yes	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (7.7%)	9 (75.0%)	<0.001*
Median (IQR) ^a	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	4 (1.5-5.25)	<0.001 ^b
Chest pain					
Yes	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (7.7%)	1 (8.3%)	0.690*
Median (IQR) ^a	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (1.5-5.25)	0.598 ^b
Headache					
Yes	0 (0.0%)	0 (0.0%)	9 (69.2%)	4 (33.3%)	<0.001*
Median (IQR) ^a	0 (0-0)	0 (0-0)	4 (0-7.0)	0 (0-1.75)	<0.001 ^b
Loss of smell					
Yes	0 (0.0%)	0 (0.0%)	8 (61.5%)	3 (25.0%)	<0.001*
Median (IQR) ^a	0 (0-0)	0 (0-0)	2 (0-3.0)	0 (0-0.25)	0.003 ^b
Loss of taste					
Yes	0 (0.0%)	0 (0.0%)	8 (61.5%)	3 (25.0%)	<0.001*
Median (IQR) ^a	0 (0-0)	0 (0-0)	2 (0-4.0)	0 (0-0.25)	0.003 ^b

Table 2. Signs and symptoms according to clinical outcome in individuals with SARS-CoV-2 infection and negative controls (n = 48). *Mild Cases-M* Non-hospitalized; *Severe Cases-S* Hospitalized. ^a Fisher's exact test. ^b Kruskal-Wallis test. ^aMedian of days between symptom onset and recruitment date (IQR, interquartile range).

Discussion

Of the 71 serum biomarkers analyzed here, 22 (EGF, IL-8, HGF, HB-EGF, VEGF-C, VEGF-A, D-dimer, GDF-15, Myoglobin, sICAM-1, MPO, P-Selectin, Lipocalin-2/NGAL, IL-6, IL-7, IL-18, IP-10, M-CSF, MDC, MIP-1 beta, PDGF-AA and TNF alpha) showed significant differences in their levels when comparing patients with SARS-CoV-2 infection to controls. We found that most of these biomarker alterations were present in severe cases. The S group was skewed to the elderly, with a median age of 62.5 ($p = 0.005$), and for the white ethnicity group with 83.3%. The most common symptoms were cough (75.0%; $p < 0.001$), sore throat (41.7%; $p = 0.014$) and dyspnea (75.0%; $p < 0.001$). These findings suggest that dysregulation of the immune response, especially in the elderly population, contributes to worsening of the disease in the acute phase.

The occurrence of the intense inflammatory process, generated in response to infection by SARS-CoV-2, damages the tissues, in which the patient may have respiratory distress, kidney failure, or heart problems, causing serious complications, with a worsening of the clinical condition, that may progress to death^{1,15,17}. In this study, most participants in the severe cases group showed important changes in the biomarkers that are part of the inflammatory process, making it possible to analyze them together with the clinical course of COVID-19 and the severity of the disease.

Cytokines, proteins that modulate the function of other cells or the cells they are generated, play important roles during COVID-19 and are related to the severity of viral infection when hyperstimulated^{18,19}. A inflammatory network associated with the severity of COVID-19 is formed by cytokines (IP-10, IL-6, IL-7 and VEGF- α), that are in significantly elevated concentrations in cases of severe pneumonia compared to mild symptoms²⁰.

In this study, it was possible to verify that the EGF was elevated in severe cases when compared to the M group ($p = 0.002$). Considering that EGF is a ligand of the epidermal growth factor receptor (EGFR), it initiates an intracellular signaling cascade by linking the extracellular domains of these receptors. Therefore, this signaling increases the potential for cell proliferation, angiogenesis, and resistance to apoptosis². Other ligands for this receptor are heparin-binding growth factor (HB-EGF) and amphiregulin²¹⁻²³. HB-EGF is among the markers of angiogenesis and growth factor; therefore, it is inferred that the change in EGF is closely linked to the change in angiogenesis as part of the process that leads to the severity of the infection.

The action of the immune response causes an acute inflammatory reaction by the action of macrophages, which secrete cytokines, such as interleukin-6 (IL-6) and induced protein 10 (IP-10)²⁴. Both the proinflammatory

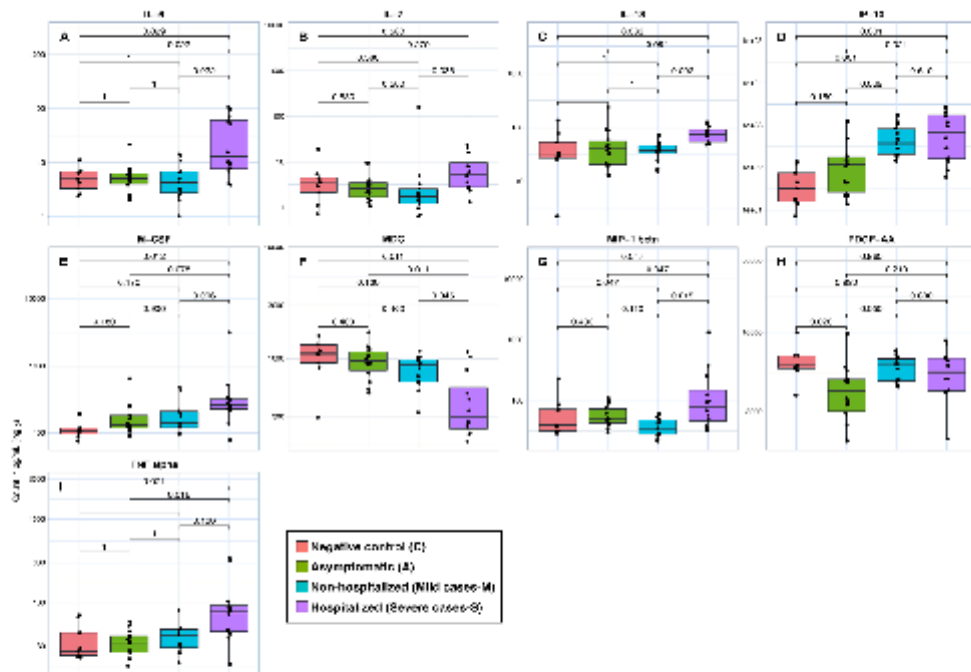


Figure 1. Box plot representation of the serum concentration (pg/mL) of cytokines/chemokines. Levels of IL-6 (A), IL-7 (B), IL-18 (E), IP-10 (G), M-CSF (H), MDC (I), MIP-1 beta (K), PDGF-AA (L), and TNF alpha (M). The top and bottom lines of boxes are the 25th and 75th percentiles, respectively, and the band in the middle of the box is the median. Statistical analysis was performed using the Mann–Whitney U test between the negative control (C), asymptomatic (A), nonhospitalized (mild cases-M), and hospitalized (severe cases-S) groups.

cytokines IL-6 and IP-10 are activators of interferon-gamma (IFN- γ), and IL-27 and IL-17 production²⁵. IL-6 stimulates acute phase protein synthesis, neutrophil production and B lymphocyte growth and inhibits the generation of regulatory T cells. IP-10 also regulates innate and adaptive immune responses, being an important signaler, through the increase in calcium inside the cell, and the more this happens, it increases phagocytic action, liberating more cytokines²⁶. High levels of IL-6, and IP-10 were found in severe cases when compared to the negative control group ($p=0.029$, 0.001 , respectively). This result suggests the presence of signals for an excessive inflammatory process in patients with COVID-19 and more commonly in critically ill patients than in nonsevere patients. A higher concentrations of IL-6 were associated with ward and ICU patients, it might contribute to use alternative therapeutic intervention with anti-IL6 in the clinical course²⁷.

The proinflammatory cytokines IL6, IL8 and TNF-alpha may be related to the D-dimer elevation. This study found high levels of IL-6, IL-8 and TNF-alpha in the severe cases when compared to the M, A and C groups. Furthermore, we identified higher levels of cytokines with direct roles in the adaptive immune response (IL-7, and IL-18) among severe cases and M groups. IL-7 is essential for the survival of mature and memory T cells, and IL-18 promote and proliferate T lymphocytes, respectively^{25,28}. IL-6 is an important marker of disease severity and is a mortality predictor. However, IL-6 also plays an important role in monitoring the therapeutic response²⁹. Another study also showed that IL-6 levels are higher in patients with sepsis than in COVID-19 cases however, IL-6 levels are still elevated in severe cases of COVID-19 compared to healthy patients³⁰. Despite this, it is not possible to confirm if the IL-6 was elevated due to the severity of the disease. The severe group has a higher median age ($p=0.005$), that can contribute to elevated IL-6^{31,32}.

MDC cytokines were reduced in hospitalized COVID-19 patients in this study, which was observed by Ling et al. (2021). This chemokine is responsible for maintaining the homeostasis of the mucosal barrier and has a protective function in inflammatory diseases, attracting macrophages to phagocytosis. Therefore, we can suggest that there was a decrease in the presence of macrophages or that only their functionality could have been inhibited, causing a breakdown in the homeostasis of the epithelium and leading to an inflammatory profile. Ling et al. (2021) suggested that the biomarker with the best performance in the late phase (8–12 days after the onset of the disease) to predict severity is the MDC³³.

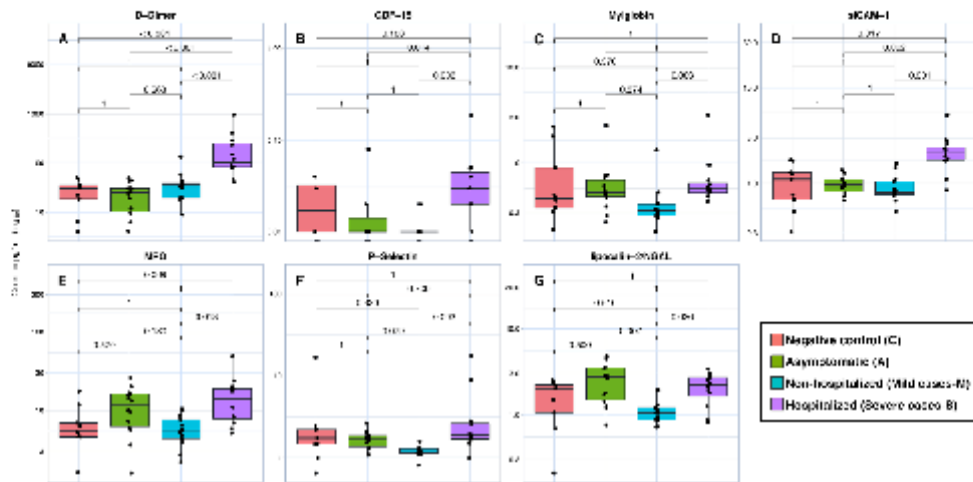


Figure 2. Box plot representation of serum concentration (pg/mL) of cardiovascular biomarkers. Levels of D-Dimer (A), GDF-15 (B), Myoglobin (C), sICAM-1 (D), MPO (E), P-Selectin (F), and Lipocalin-2/NGAL (G). The top and bottom lines of boxes are the 25th and 75th percentiles, respectively, and the band in the middle of the box is the median. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test between the negative control (C), asymptomatic (A), nonhospitalized (mild cases-M), and hospitalized (severe cases-S) groups.

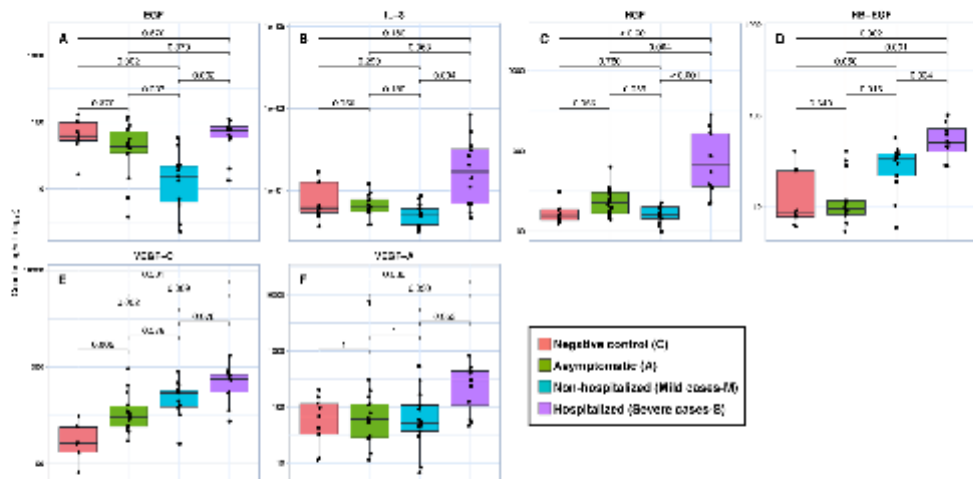


Figure 3. Box plot representation of the serum concentration (pg/mL) of angiogenesis biomarkers. Levels of EGF (A), IL-8 (B), HGF (C), HB-EGF (D), VEGF-C (E), and VEGF-A (F). The top and bottom lines of the boxes are the 25th and 75th percentiles, respectively, and the band in the middle of the box is the median. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test between the negative control (C), asymptomatic (A), nonhospitalized (mild cases-M), and hospitalized (severe cases-S) groups.

This study found that heart disease markers such as D-dimer, and sICAM-1 were elevated in severe cases. Measuring D-dimer levels has been used to predict disease severity. D-dimer has been widely used as a biomarker for thrombotic disorders, once as a fibrin degradation product^{35,36}. D-dimer levels were higher when comparing the severe cases versus mild cases, asymptomatic and the negative control groups ($p < 0.001$). Some studies describe D-dimer as a predictive biomarker of mortality, which can be an easy-to-perform and low-cost laboratory indicator for prognosis and pretreatment to avoid thrombosis episodes^{35,36}.

Although the levels of GDF-15 were lower in the asymptomatic and non-hospitalized (mild) cases compared to the control group, these differences were not statistically significant ($p = 1.00$). Thus, it is not possible to ascertain whether there is a downregulation of the GDF-15 production among subjects with asymptomatic or mild SARS-CoV-2 infection compared to subjects in the control group. In contrast, the GDF-15 levels were statistically greater among the subjects with severe COVID-19 compared to the asymptomatic and mild groups, but not in the comparison with the control group. The non-significant higher levels of GDF-15 among subjects with severe COVID-19 compared to controls may be due to insufficient power, given that increased levels of GDF-15 have been associated with an increased risk of ICU admission and mortality among COVID-19^{37,38}, and with postponing withdrawal of mechanical ventilation and late recovery (Ebihara et al. 2021)³⁰. Our findings, together with those from other studies suggest that GDF-15 is increased in patients with severe COVID-19, but not in asymptomatic or mild infections.

Soluble intercellular adhesion molecule 1 (sICAM-1) represents a circulating form of ICAM-1. The interaction between ICAM-1, present in endothelial cells, and LFA-1 facilitates the adhesion and migration of leukocytes through the endothelium. ICAM-1 and its circulating form have been implicated in the development of numerous diseases³⁹. In this study, we found that this molecule presented high levels in group S compared to groups C, A and M and obtained significant differences, suggesting that sICAM-1 is involved in the inflammatory process of severe cases of SARS-CoV-2 infection. According to our study, group S presented high levels of TNF-alpha, which contributes to endothelial activation processes and vascular occlusion, suggesting that sICAM-1 is a predictor for severe cases of COVID-19.

Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) presented significantly higher levels in the samples of the severe cases (S) than in the samples of the asymptomatic cases (A) and negative controls (C) ($p = 0.030$ and $p = 0.036$, respectively). Yin et al.⁴⁰ suggested that VEGF may be a notable target for the treatment of patients with SARS-CoV-2. This growth factor is related to increased vascular permeability at the pulmonary level, causing plasma extravasation and, later, pulmonary edema⁴¹. Anti-VEGF therapy has also been investigated for patients with neurological signs, since VEGF is related to the stimulation of an inflammatory response in the central nervous system (CNS) through lymphocyte recruitment and increased release of proinflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α ⁴².

Vascular endothelial growth factor type C (VEGF-C) presented a different profile from that observed for VEGF-A. VEGF-C showed differences in concentrations between all groups when compared with the Negative Control (C). The levels in C were lower than those in A ($p = 0.009$), M ($p = 0.002$) and S ($p = 0.001$)^{43,44}. The data suggest that the concentration of this glycoprotein increases with the severity of the disease, as they are related to the lymphatic system and endothelial cells, and the high levels cause increased vascular permeability and worsening of endothelial damage. Studies addressing VEGF-C in the context of COVID-19 are still quite uncommon, which reinforces the importance of deepening the investigation of the role of this biomarker in the immunopathology of COVID-19.

Similar to VEGF-A, hepatocyte growth factor (HGF) presented significantly higher levels in group S than in the other groups (M, A, and C), with even more pronounced differences ($p < 0.001$). Other studies have shown that the concentrations of this cytokine are higher in symptomatic patients or those with more severe clinical conditions than in groups of asymptomatic patients or those with fewer cases of COVID-19^{34,45}. According to them, HGF elevation is a counterregulatory immune mechanism in response to the elevation of CXCL13 and other proinflammatory cytokines during SARS-CoV-2 infection⁴⁴. In addition, Guo et al.⁴⁶ identified a positive and significant correlation between high levels of HGF and IL-1 β and the severity of COVID-19 determined by the APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation) score based on the dosage of these analytes in the peripheral blood of nine patients.

The evaluation of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) showed an interesting profile in the study groups: although a significant difference in protein levels was obtained between groups S and M (with S presenting higher values), HB-EGF levels in the C and A groups were much lower compared to the two groups with symptomatic patients. The largest difference was between groups S and A ($p = 0.001$). There were no significant differences between the C and A groups. The data then suggest that it is a macromolecule that may be related to the development of symptoms in COVID-19 or that its elevation is due to some counterregulatory mechanism and that, like HGF, it can be used as a biomarker of severity. This protein has biological functions in several tissues, and among its activities are endometrial maturation and the protection of endometrial stromal cells^{46,47}. The soluble form (sHB-EGF) is a potent mitogen and chemoattractive to a wide variety of cells, including vascular smooth muscle cells, fibroblasts and keratinocytes. HB-EGF has been implicated in different pathological processes, such as cardiac hypertrophy^{48,49}, smooth muscle cell hyperplasia and atherosclerotic plaque formation⁵⁰⁻⁵², oncogenic transformation^{53,54} and even hypertension and pulmonary fibrosis⁵⁵⁻⁵⁷.

There are some limitations to this study. The number of participants were similar among black ($n = 24$) and white ($n = 21$) ethnicity. However, there is differences in severe group (83.3% were white; $p = 0.010$). This results differ from previous studies which black ethnicity had higher risk for infection and hospitalization⁵⁸ and probably related to convenience selection using no-probability sampling. Biomarker analysis was performed in the blood sample collected at patient enrollment, and no additional samples were obtained during the follow-up of the participants for comparative analysis. Another important limitation is that we do not have complete data on disease severity in patients who were hospitalized (i.e., use of mechanical ventilation, vasoactive drugs, dialysis, length of stay in an intensive care unit, and other aspects related to severity). The multiple comparisons may have led to the identification of casual differences, which do not necessarily represent reality, but rather a type II error related to sample variability, which may reflect in the lower levels of EGF in the mild cases than in the control group. Although this study analyzed a large number of biomarkers (71 biomarkers) and suggested a correlation of some with the severity of COVID-19, we did not analyze other markers associated with the severity of COVID, such as CHI3L1 and IGFBP3⁵⁹, CXCL8, CXCL10, and CCL20⁶⁰. Finally, this study is underpower

and is not intended to be definitive or conclusive on the subject, but to contribute to the investigation of the relationship between biomarkers and disease severity.

Due to the rapid spread of COVID-19 and the high capacity of mutation of the SARS-CoV-2 virus, it is necessary to better understand the biomarkers that describe the immune response associated with infection and how they correlate with disease severity. This is the first comprehensive study in Brazil that identified and described the immune response and biological markers related to angiogenesis and infection factors, heart disease, and cytokine production in SARS-CoV-2-infected individuals.

Materials and methods

Study population, eligibility criteria and data collection. This study is part of the Multicentric study of the Natural History of the Novel Coronavirus SARS-CoV-2 in Brazil (REBRACOVID). We included participants from four Brazilian cities (Campo Grande-MS, Dourados-MS, Maringá-PR and Recife-PE) with laboratory and analytical approaches from October 2020 to June 2021. Individuals over 18 years of age with clinical suspicion of flu-like symptoms (defined by the presence of flu-like symptoms for up to 11 days) and confirmed COVID-19 by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) were included (index cases). We collected swabs and blood samples from index cases and household contacts of index cases, regardless of whether the contacts had symptoms. The index cases and contacts were categorized according to RT-qPCR results and outcomes into four (4) groups: negative control (C), asymptomatic (A), nonhospitalized (mild cases-M), and hospitalized (severe cases-S).

For this study, we analyzed the data for participants who met the following criteria: (1) had RT-qPCR results; (2) had sufficient blood samples for all tests; (3) had complete data on symptoms and sociodemographic characteristics, and (4) fit into one of the four study groups (C, A, M and S).

Biological samples and laboratory procedures. Nasopharyngeal swabs were collected for the detection of infection by SARS-CoV-2 by RT-qPCR using a mix of GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR Systems, Promega, and specific primers and probes (IDT). Biomarker analysis was performed on serum samples. Aliquots with 500 μ L of serum, stored in a -20 °C freezer, were obtained from 15 mL of blood collected in Gel SST tubes and centrifuged at 2,000 rpm. Multiplex bead-based assays were performed using MAGPIX Luminex[®] xMAP[®] technology on serum samples from these participants using three different MILLIPLIX[®] Map panels: (1) Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A Magnetic Bead Panel, (2) Human Cardiovascular Disease (CVD) Magnetic Bead Panel 2 and (3) Human Angiogenesis/Growth Factor Magnetic Bead Panel 1. A total of 74 distinct bead populations were evaluated, these being analytes related to cytokines/chemokines (47), cardiovascular diseases (10), and angiogenesis and growth factor (17) (Supplementary Table 1).

Data analysis. The values obtained through the Multiplex test were analyzed in R version 4.2.1 and RStudio 2022.02.2 software. The Kruskal–Wallis test was applied, and markers that presented $p < 0.05$ were selected and later analyzed through post hoc analysis by the Mann–Whitney U test and Bonferroni correction for multiple comparisons between groups. We used simple descriptive statistics to characterize the participants according to sex, age group, ethnicity, signs and symptoms.

Ethics statements. This study was carried out with the approval of the Research Ethics Committee of the Federal University of Mato Grosso do Sul, under protocol number 4,383.724 CAAE 32874720.8.2001.0021. All research was performed in accordance with relevant guidelines and regulations. The Informed Consent Term was obtained from all participants.

Data availability

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation. To request the data can be made directly with the corresponding author Dr. Julio Croda.

Received: 4 May 2022; Accepted: 8 September 2022

Published online: 26 September 2022

References

- BRASIL. Ministério da saúde. Diretrizes para diagnóstico e tratamento da Covid-19. Brasília-DF (2020).
- Samprathi, M. & Jayashree, M. Biomarkers in COVID-19: An up-to-date review. *Front. Pediatr.* **8**, 607647 (2020).
- Wang, C. et al. Alveolar macrophage dysfunction and cytokine storm in the pathogenesis of two severe COVID-19 patients. *EBioMedicine* **57**, 102833 (2020).
- Tay, M. Z., Poh, C. M., Rénia, L., MacAry, P. A. & Ng, L. F. P. The trinity of COVID-19: Immunity, inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8> (2020).
- Quint, I. et al. A possible role for B cells in COVID-19? Lesson from patients with agammaglobulinemia. *J. Allergy Clin. Immunol.* **146**, 211–213.e4 (2020).
- D’Onofrio, V. et al. Studying the clinical, radiological, histological, microbiological, and immunological evolution during the different COVID-19 disease stages using minimal invasive autopsy. *Sci. Rep.* **12**, 1360 (2022).
- Liu, P. P., Blet, A., Smyth, D. & Li, H. The science underlying COVID-19: Implications for the cardiovascular system. *Circulation* **142**, 68–78 (2020).
- Tang, N. et al. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. *J. Thromb. Haemost.* **18**, 1094–1099 (2020).
- Forlida, A. & Pola, R. Venous thromboembolism in COVID-19 patients. *J. Thromb. Haemost.* **18**, 1516–1517 (2020).
- Gandhi, R. T., Lynch, J. B. & Del Rio, C. Mild or moderate Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **383**, 1757–1766 (2020).

11. Alhazzani, W. *et al.* Surviving sepsis campaign: Guidelines on the management of critically ill adults with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Intensive Care Med.* **46**, 854–887 (2020).
12. Xie, J. *et al.* Association between hypoxemia and mortality in patients with COVID-19. *Minjy Clin. Proc.* **95**, 1138–1147 (2020).
13. Ahn, M., Zbiri, S., Nejjari, S., Ousti, F. & Elkettani, C. C-reactive protein as an early predictor of COVID-19 severity. *J. Med. Biochem.* **39**, 500–507 (2020).
14. Chen, N. *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: A descriptive study. *Lancet* **395**, 507–513 (2020).
15. Wu, C. *et al.* Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Internal Med.* **180**, 934–943 (2020).
16. Liu, T. *et al.* The role of Interleukin-6 in monitoring severe case of coronavirus disease 2019. *EMBO Mol. Med.* **12**, e12421 (2020).
17. Panda, S. K. & Colonna, M. Innate lymphoid cells in mucosal immunity. *Front. Immunol.* **10**, 861 (2019).
18. Mehta, P. *et al.* COVID-19: Consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* **395**, 1033–1034 (2020).
19. Zhou, F. *et al.* Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: A retrospective cohort study. *Lancet* **395**, 1054–1062 (2020).
20. Vacharathit, V. *et al.* SARS-CoV-2 neutralizing antibodies decline over one year and patients with severe COVID-19 pneumonia display a unique cytokine profile. *Int. J. Infect. Dis.* **112**, 227–234 (2021).
21. Faria, J. A. Q. A., de Andrade, C., Goes, A. M., Rodrigues, M. A. & Gomes, D. A. Effects of different ligands on epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **478**, 39–45 (2016).
22. Raab, G. & Klagsbrun, M. Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochem. Biophys. Acta* **1333**, F179–199 (1997).
23. Singh, B., Carpenter, G. & Coffey, R. J. EGF receptor ligands: Recent advances. Preprint at <https://doi.org/10.12688/f1000research.9025.1> (2016).
24. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* **395**, 497–506 (2020).
25. Benjamin, D., Knobloch, T. J. & Dayton, M. A. Human B-cell interleukin-10: B-cell lines derived from patients with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of interleukin-10. *Blood* **80**, 1289–1298 (1992).
26. Thompson-Snipes, L. *et al.* Interleukin 10: A novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J. Exp. Med.* **173**, 507–510 (1991).
27. de Bruin, S. *et al.* Clinical features and prognostic factors in Covid-19: A prospective cohort study. *EBioMedicine* **67**, 103378 (2021).
28. Wool, G. D. & Miller, J. L. The impact of COVID-19 disease on platelets and coagulation. *Pathobiology* **88**, 15–27 (2021).
29. Qin, C. *et al.* Dysregulation of immune response in patients with coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis.* **71**, 762–768 (2020).
30. Eshara, T. *et al.* Cytokine elevation in severe COVID-19 from longitudinal proteomics analysis: Comparison with sepsis. *Front. Immunol.* **12**, (2022).
31. Ershler, W. & Keller, E. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu. Rev. Med.* **51**, 245 (2000).
32. Tartaro, D. L. *et al.* Molecular and cellular immune features of aged patients with severe COVID-19 pneumonia. *Commun. Biol.* **5**, 590 (2022).
33. Ling, L. *et al.* Longitudinal cytokine profile in patients with mild to critical COVID-19. *Front. Immunol.* **12**, (2021).
34. Yao, Y. *et al.* D-dimer as a biomarker for disease severity and mortality in COVID-19 patients: A case control study. *J. Intensive Care Med.* **49** (2020).
35. Zhang, L. *et al.* D-dimer levels on admission to predict in-hospital mortality in patients with Covid-19. *J. Thromb. Haemost.* **18**, 1324–1329 (2020).
36. Qeadan, F. *et al.* Prognostic values of serum ferritin and D-dimer trajectory in patients with COVID-19. *Viruses* **13**, 419 (2021).
37. Poudel, A. *et al.* D-dimer as a biomarker for assessment of COVID-19 prognosis: D-dimer levels on admission and its role in predicting disease outcome in hospitalized patients with COVID-19. *PLoS ONE* **16**, e0256744 (2021).
38. Myhre, P. L. *et al.* Growth differentiation factor 15 provides prognostic information superior to established cardiovascular and inflammatory biomarkers in unselected patients hospitalized with COVID-19. *Circulation* **142**, 2128–2137 (2020).
39. Lawson, C., Ainsworth, M., Yacoub, M. & Rose, M. Ligand of ICAM-1 on endothelial cells leads to expression of VCAM-1 via a nuclear factor- κ B-independent mechanism. *J. Immunol.* **162**, 2990–2996 (1999).
40. Yin, X.-X., Zheng, X.-R., Peng, W., Wu, M.-L. & Mao, X.-Y. Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a vital target for brain inflammation during the COVID-19 outbreak. *ACS Chem. Neurosci.* **11**, 1704–1705 (2020).
41. Kaner, R. J. *et al.* Lung overexpression of the vascular endothelial growth factor gene induces pulmonary edema. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **22**, 657–664 (2000).
42. Marit, H. H. & Risau, W. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15809–15814 (1998).
43. Tamayo-Velasco, A. *et al.* HGF, IL-1 α , and IL-27 are robust biomarkers in early severity stratification of COVID-19 patients. *J. Clin. Med.* **10**, 2017 (2021).
44. Perreau, M. *et al.* The cytokines HGF and CXCL13 predict the severity and the mortality in COVID-19 patients. *Nat. Commun.* **12**, 4888 (2021).
45. Guo, J. *et al.* Cytokine Signature Associated With Disease Severity in COVID-19. *Front. Immunol.* **12**, 3276 (2021).
46. Iwamoto, R. & Mekada, E. Heparin-binding EGF-like growth factor: A juxtacrine growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev.* **11**, 335–344 (2000).
47. Chobotova, K. *et al.* Heparin-binding epidermal growth factor and its receptors mediate decidualization and potentiate survival of human endometrial stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 913–919 (2005).
48. Young, S. L. *et al.* In vivo and in vitro evidence suggest that HB-EGF regulates endometrial expression of human decay-accelerating factor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 1368–1375 (2002).
49. Asakura, M. *et al.* Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: Metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat. Med.* **8**, 35–40 (2002).
50. Lee, K.-S., Park, J.-H., Lim, H.-J. & Park, H.-Y. HB-EGF induces cardiomyocyte hypertrophy via an ERK5-MEF2A-COX2 signaling pathway. *Cell Signal* **23**, 1100–1109 (2011).
51. Miyagawa, J. *et al.* Localization of heparin-binding EGF-like growth factor in the smooth muscle cells and macrophages of human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* **95**, 404–411 (1995).
52. Sánchez-Vizcaíno, E. *et al.* Heparin-binding EGF-like growth factor in human serum. Association with high blood cholesterol and heart hypertrophy. *Growth Factors* **28**, 98–103 (2010).
53. Tsuchida, S. *et al.* Anti-HB-EGF antibody-mediated delivery of siRNA to atherosclerotic lesions in mice. *Int. Heart J.* **59**, 1425–1431 (2018).
54. Hsieh, C.-H. *et al.* A targetable HB-EGF-CITRD4 axis controls oncogenesis in lung cancer. *Oncogene* **36**, 2946–2956 (2017).
55. Wang, L. *et al.* HB-EGF Activates the EGFR/HIF-1 α pathway to induce proliferation of arsenic-transformed cells and tumor growth. *Front. Oncol.* **10**, 1019 (2020).
56. Eapen, M. S. *et al.* Heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) drives EMT in patients with COPD: Implications for disease pathogenesis and novel therapies. *Lab Invest.* **99**, 150–157 (2019).

57. Li, Y. *et al.* HB-EGF-induced IL-8 secretion from airway epithelium leads to lung fibroblast proliferation and migration. *BMC Pulm. Med.* **21**, 347 (2021).
58. Pan, L. H., Ohtani, H., Yamauchi, K. & Nagura, H. Co-expression of TNF alpha and IL-1 beta in human acute pulmonary fibrotic diseases: An immunohistochemical analysis. *Pathol. Int.* **46**, 91–99 (1996).
59. Kimura, Y. *et al.* Identification of serum prognostic biomarkers of severe COVID-19 using a quantitative proteomic approach. *Sci. Rep.* **11**, 20638 (2021).
60. COVID-19 Multi-omics Blood Atlas (COMBAT) Consortium. Electronic address: julian.knight@well.ox.ac.uk & COVID-19 Multi-omics Blood Atlas (COMBAT) Consortium. A blood atlas of COVID-19 defines hallmarks of disease severity and specificity. *Cell* **185**, 916–938.e58 (2022).

Acknowledgements

The authors thank all the technical teams that participated in the data collection, sample collection and processing of biological samples. The authors would like to thank all REBRACOVID project teams and the municipal and state Health Departments of the cities Campo Grande-MS, Dourados-MS, Fortaleza-CE, Maringá-PR, Porto Velho-RO, Recife-PE, Ribeirão Preto-SP, Rio de Janeiro-RJ and Salvador-BA that gave support to the centers participating in the study.

Author contributions

Designing research study: E.B., P.S., R.O., G.D., M.C., E.N., L.C., M.R., A.S., J.C. Conducting experiments: E.B., M.P.P.S., B.S., M.T. Acquiring data: E.B., M.P.P.S., R.O., P.S., M.P.C.G., R.S., N.F., A.A., G.D., M.C., E.N., I.F., L.C., K.T., G.R., M.R., R.B., A.S., D.A., J.C. Analyzing data: J.C., D.T., E.B., M.P. Writing the manuscript: E.B., M.P., J.C. Revising the manuscript: P.S., R.O., P.S., M.P.C.G., R.S., N.F., A.A., G.D., M.C., M.C., E.N., I.F., L.C., K.T., G.R., M.R., R.B., A.S., D.A. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

J.C. is supported by the Oswaldo Cruz Foundation (Edital COVID-19 – resposta rápida: 48111668950485). GSR is supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, 311365/2021-3) and the Bahia's research Support Foundation (FAPESB, SUS0019/2021).

Competing interests

The authors declare no competing interests.


Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20062-5>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.C.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

5 CONCLUSÕES

Este é o primeiro estudo compressivo no Brasil que identificou e descreveu níveis de marcadores biológicos relacionados a resposta imunológica na produção de citocinas, fatores de angiogênese e doenças cardíacas, e que foram correlacionados com o quadro clínico de indivíduos infectados por SARS-CoV-2.

Esta pesquisa pode avaliar que a maioria dos biomarcadores (EGF, IL-8, HGF, HB-EGF, VEGF-C, VEGF-A, D-dímero, sICAM-1, IL-6, IP-10, M-CSF, MDC, MIP-1 beta) apresentaram os níveis elevados entre os participantes que necessitaram de hospitalização para tratar a COVID-19.

Ao descrever as principais diferenças, pode-se observar que a maioria das alterações dos biomarcadores quando comparados entre os grupos Negativo (C), assintomático (A), não hospitalizado (leve-M) e hospitalizado (grave-S), apresentaram diferença estatisticamente significativa. Além disso, esses resultados possibilitaram descrever alterações que estão de acordo com o perfil da resposta imunológica exacerbada, que desencadeia a tempestade de citocinas, assim como considerar que pacientes com COVID-19 grave têm possível relação com a disfunção de múltiplos órgãos, uma vez que o grupo grave-S mostrou níveis aumentados dos biomarcadores relacionados aos sistemas cardíaco e endotelial.

No entanto, devido à rápida disseminação do COVID-19 e à alta capacidade de mutação do vírus SARS-COV-2, reiteramos que o perfil desses biomarcadores ainda precisam ser elucidados quanto a finalidade de avaliar a eficiência e à correlação com a gravidade da COVID-19, visando melhorar à associação com a evolução clínica, monitoramento e os fatores de riscos dos indivíduos.

REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, M. et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 2, p. 120–128, 9 jul. 2020.
- AHNACH, M. et al. C-reactive protein as an early predictor of COVID-19 severity. **Journal of Medical Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 500–507, 2 out. 2020.
- ALHAZZANI, W. et al. Surviving Sepsis Campaign: guidelines on the management of critically ill adults with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Intensive Care Medicine**, v. 46, n. 5, p. 854–887, 2020.
- ASSELAH, T. et al. COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development. **Journal of Hepatology**, v. 74, n. 1, p. 168–184, jan. 2021.
- BANSAL, M. Cardiovascular disease and COVID-19. **Diabetes & Metabolic Syndrome**, v. 14, n. 3, p. 247–250, jun. 2020.
- BARTON, L. M. et al. COVID-19 Autopsies, Oklahoma, USA. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 153, n. 6, p. 725–733, 5 maio 2020.
- BEECHING, N. J. et al. **Coronavirus disease (COVID-19)**. BMJ Best Practice, , 1 maio 2020. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbnmnibpcjpcglclefindmkaj/https://www.sbn.org.br/fileadmin/diversos/BMJ_Best_Practice_COVID_May_2020.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2022
- BERMEJO-MARTIN, J. F. et al. COVID-19 as a cardiovascular disease: the potential role of chronic endothelial dysfunction. **Cardiovascular Research**, v. 116, n. 10, p. e132–e133, 1 ago. 2020.
- BERNHEIM, A. et al. Chest CT Findings in Coronavirus Disease-19 (COVID-19): Relationship to Duration of Infection. **Radiology**, v. 295, n. 3, p. 200463, jun. 2020.
- BEYERSTEDT, S.; CASARO, E. B.; RANGEL, É. B. COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 905–919, maio 2021.
- CASCELLA, M. et al. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19). Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.
- CERAOLO, C.; GIORGI, F. M. Genomic variance of the 2019-nCoV coronavirus. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 5, p. 522–528, maio 2020.
- CHEN, G. et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 5, p. 2620–2629, 1 maio 2020a.

CHEN, N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10223, p. 507–513, 15 fev. 2020b.

CORRALES-MEDINA, V. F. et al. Acute pneumonia and the cardiovascular system. **The Lancet**, v. 381, n. 9865, p. 496–505, 9 fev. 2013.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z.-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181–192, mar. 2019.

CUI, S. et al. Prevalence of venous thromboembolism in patients with severe novel coronavirus pneumonia. **Journal of thrombosis and haemostasis: JTH**, v. 18, n. 6, p. 1421–1424, jun. 2020.

DAVIDSON, J. A.; WARREN-GASH, C. Cardiovascular complications of acute respiratory infections: current research and future directions. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 17, n. 12, p. 939–942, dez. 2019.

DENG, Q. et al. Suspected myocardial injury in patients with COVID-19: Evidence from front-line clinical observation in Wuhan, China. **International Journal of Cardiology**, v. 311, p. 116–121, 15 jul. 2020.

DIAO, B. et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 827, 2020.

D'ONOFRIO, V. et al. Studying the clinical, radiological, histological, microbiological, and immunological evolution during the different COVID-19 disease stages using minimal invasive autopsy. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1360, 25 jan. 2022.

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

FELSENSTEIN, S. et al. COVID-19: Immunology and treatment options. **Clinical Immunology (Orlando, Fla.)**, v. 215, p. 108448, jun. 2020.

FILCHAKOVA, O. et al. Review of COVID-19 testing and diagnostic methods. **Talanta**, v. 244, p. 123409, 1 jul. 2022.

FLEURY, M. K. A COVID-19 e o laboratório de hematologia: uma revisão da literatura recente. **Rev. bras. anal. clin.**, p. 131–137, 2020.

GAFFNEY, P. Breakdown products of fibrin and fibrinogen: molecular mechanisms and clinical implications. **Journal of Clinical Pathology. Supplement (Royal College of Pathologists)**, v. 14, p. 10–17, 1980.

GALLAGHER, P. E.; FERRARIO, C. M.; TALLANT, E. A. Regulation of ACE2 in cardiac myocytes and fibroblasts. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 295, n. 6, p. H2373–H2379, dez. 2008.

GANDHI, R. T.; LYNCH, J. B.; DEL RIO, C. Mild or Moderate Covid-19. **The New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 18, p. 1757–1766, 29 out. 2020.

GOLDSMITH, C. S. et al. Ultrastructural Characterization of SARS Coronavirus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 2, p. 320–326, fev. 2004.

GOSHUA, G. et al. Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-centre, cross-sectional study. **The Lancet. Haematology**, v. 7, n. 8, p. e575–e582, ago. 2020.

GRASSELLI, G.; PESENTI, A.; CECCONI, M. Critical Care Utilization for the COVID-19 Outbreak in Lombardy, Italy: Early Experience and Forecast During an Emergency Response. **JAMA**, v. 323, n. 16, p. 1545–1546, 28 abr. 2020.

GUAN, W.-J. et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. **The New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 18, p. 1708–1720, 30 abr. 2020.

GUPTA, A. et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. 7, p. 1017–1032, jul. 2020.

HARISHA, E. J. et al. Liver: Function and dysfunction in COVID-19. **Journal of Family Medicine and Primary Care**, v. 11, n. 2, p. 758–761, fev. 2022.

HELMY, Y. A. et al. The COVID-19 Pandemic: A Comprehensive Review of Taxonomy, Genetics, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 4, p. 1225, 24 abr. 2020.

HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271–280.e8, 16 abr. 2020.

HONG, J. et al. Structure of SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein for Therapeutic and Preventive Target. **Immune Network**, v. 21, n. 1, p. e8, 19 fev. 2021.

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

HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, 15 fev. 2020.

HUERTAS, A. et al. Endothelial cell dysfunction: a major player in SARS-CoV-2 infection (COVID-19)? **The European Respiratory Journal**, v. 56, n. 1, p. 2001634, jul. 2020.

JOSE, R. J.; MANUEL, A. COVID-19 cytokine storm: the interplay between inflammation and coagulation. **The Lancet. Respiratory Medicine**, v. 8, n. 6, p. e46–e47, jun. 2020.

KIM, J. S. et al. Immunopathogenesis and treatment of cytokine storm in COVID-19. **Theranostics**, v. 11, n. 1, p. 316–329, 2021.

LAI, C.-C. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, n. 3, p. 105924, mar. 2020.

LEE, D. W. et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. **Blood**, v. 124, n. 2, p. 188–195, 10 jul. 2014.

LEVI, M. et al. Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation. British Committee for Standards in Haematology. **British Journal of Haematology**, v. 145, n. 1, p. 24–33, abr. 2009.

LI, Q. et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. **The New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 13, p. 1199–1207, 26 mar. 2020a.

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

LIU, J. et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. **EBioMedicine**, v. 55, p. 102763, maio 2020a.

LIU, P. P. et al. The Science Underlying COVID-19: Implications for the Cardiovascular System. **Circulation**, v. 142, n. 1, p. 68–78, 7 jul. 2020b.

LIU, T. et al. The role of interleukin-6 in monitoring severe case of coronavirus disease 2019. **EMBO molecular medicine**, v. 12, n. 7, p. e12421, 7 jul. 2020c.

LONG, Q.-X. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. 6, p. 845–848, jun. 2020.

LU, J.; SUN, P. D. High affinity binding of SARS-CoV-2 spike protein enhances ACE2 carboxypeptidase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 52, p. 18579–18588, 25 dez. 2020.

MARQUES, R. E. et al. Exploring the Homeostatic and Sensory Roles of the Immune System. **Frontiers in Immunology**, v. 7, 2016.

MARTINS-FILHO, P. R.; BARRETO-FILHO, J. A. S.; SANTOS, V. S. Biomarcadores de Lesão Miocárdica e Complicações Cardíacas Associadas à Mortalidade em Pacientes com COVID-19. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 115, p. 273–277, 28 ago. 2020.

MCGONAGLE, D. et al. The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 19, n. 6, p. 102537, 1 jun. 2020.

MEHTA, P. et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. **The Lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1033–1034, 28 mar. 2020.

MENDOZA-TORRES, E. et al. ACE2 e peptídeos vasoativos: novos atores no remodelamento cardiovascular/renal e hipertensão. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**, v. 9, n. 4, p. 217–237, 1 ago. 2015.

MENG, T. et al. **The insert sequence in SARS-CoV-2 enhances spike protein cleavage by TMPRSS**. bioRxiv, , 16 fev. 2020. Disponível em:

<<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.08.926006v3>>. Acesso em: 24 fev. 2023

MILBRANDT, E. B. et al. Prevalence and significance of coagulation abnormalities in community-acquired pneumonia. **Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 15, n. 11–12, p. 438–445, dez. 2009.

MOLAEI, S. et al. The immune response and immune evasion characteristics in SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2: Vaccine design strategies. **International Immunopharmacology**, v. 92, p. 107051, mar. 2021.

MOORE, J. B.; JUNE, C. H. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. **Science (New York, N.Y.)**, v. 368, n. 6490, p. 473–474, 1 maio 2020.

ONG, E. Z. et al. A Dynamic Immune Response Shapes COVID-19 Progression. **Cell Host & Microbe**, v. 27, n. 6, p. 879- 882.e2, 10 jun. 2020.

PAHO; WHO. **Epidemiological Update: Novel coronavirus (nCoV) - 20 January 2020 - PAHO/WHO | Pan American Health Organization**. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/documents/epidemiological-update-novel-coronavirus-ncov-20-january-2020>>. Acesso em: 31 maio. 2022.

PATHANGEY, G. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 and COVID-19: patients, comorbidities, and therapies. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 320, n. 3, p. L301–L330, 1 mar. 2021.

PEDERSEN, S. F.; HO, Y.-C. SARS-CoV-2: a storm is raging. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 5, p. 2202–2205, 1 maio 2020.

PONS, S. et al. The vascular endothelium: the cornerstone of organ dysfunction in severe SARS-CoV-2 infection. **Critical Care (London, England)**, v. 24, n. 1, p. 353, 16 jun. 2020.

PORFIDIA, A.; POLA, R. Venous thromboembolism in COVID-19 patients. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 6, p. 1516–1517, 2020.

QIN, C. et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, p. ciaa248, 12 mar. 2020a.

QIN, C. et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 71, n. 15, p. 762–768, 28 jul. 2020b.

QUINTI, I. et al. A possible role for B cells in COVID-19? Lesson from patients with agammaglobulinemia. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 146, n. 1, p. 211- 213.e4, jul. 2020.

RAI, P. et al. Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 2, p. 441–455, jan. 2021.

RODELO, J. R. et al. D-dimer is a significant prognostic factor in patients with suspected infection and sepsis. **The American Journal of Emergency Medicine**, v. 30, n. 9, p. 1991–1999, nov. 2012.

ROTHAN, H. A.; BYRAREDDY, S. N. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. **Journal of Autoimmunity**, v. 109, p. 102433, maio 2020.

RUAN, Q. et al. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. **Intensive Care Medicine**, v. 46, n. 5, p. 846–848, maio 2020.

SAMPRATHI, M.; JAYASHREE, M. Biomarkers in COVID-19: An Up-To-Date Review. **Frontiers in Pediatrics**, v. 8, p. 607647, 2020.

SHI, Y. et al. COVID-19 infection: the perspectives on immune responses. **Cell Death and Differentiation**, v. 27, n. 5, p. 1451–1454, maio 2020.

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

STOKES, E. K. et al. Coronavirus Disease 2019 Case Surveillance - United States, January 22-May 30, 2020. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 69, n. 24, p. 759–765, 19 jun. 2020.

SUNDARAM, M. E. et al. Individual and social determinants of SARS-CoV-2 testing and positivity in Ontario, Canada: a population-wide study. **CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 193, n. 20, p. E723–E734, 17 maio 2021.

SWIRSKI, F. K. Inflammation and CVD in 2017: From clonal haematopoiesis to the CANTOS trial. **Nature Reviews. Cardiology**, v. 15, n. 2, p. 79–80, fev. 2018.

TAN, W. et al. A Novel Coronavirus Genome Identified in a Cluster of Pneumonia Cases — Wuhan, China 2019–2020. **China CDC Weekly**, v. 2, n. 4, p. 61–62, 1 jan. 2020.

TANG, N. et al. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. **Journal of thrombosis and haemostasis: JTH**, v. 18, n. 5, p. 1094–1099, maio 2020.

TAVAZZI, G. et al. Myocardial localization of coronavirus in COVID-19 cardiogenic shock. **European Journal of Heart Failure**, v. 22, n. 5, p. 911–915, maio 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, jun. 2020.

TONG, M. et al. Elevated Expression of Serum Endothelial Cell Adhesion Molecules in COVID-19 Patients. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 222, n. 6, p. 894–898, 17 ago. 2020.

- UDELL, J. A. et al. Association between influenza vaccination and cardiovascular outcomes in high-risk patients: a meta-analysis. **JAMA**, v. 310, n. 16, p. 1711–1720, 23 out. 2013.
- VABRET, N. et al. Immunology of COVID-19: Current State of the Science. **Immunity**, v. 52, n. 6, p. 910–941, 16 jun. 2020.
- VARGA, Z. et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. **The Lancet**, v. 395, n. 10234, p. 1417–1418, 2 maio 2020.
- WALLS, A. C. et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 281–292.e6, 16 abr. 2020.
- WANG, C. et al. Alveolar macrophage dysfunction and cytokine storm in the pathogenesis of two severe COVID-19 patients. **EBioMedicine**, v. 57, p. 102833, jul. 2020a.
- WANG, D. et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA**, v. 323, n. 11, p. 1061–1069, 17 mar. 2020b.
- WANG, Y. et al. Temporal Changes of CT Findings in 90 Patients with COVID-19 Pneumonia: A Longitudinal Study. **Radiology**, v. 296, n. 2, p. E55–E64, ago. 2020c.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Coronavirus Disease (COVID-19) Situation Reports**. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>>. Acesso em: 25 mar. 2022.
- WIERSINGA, W. J. et al. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. **JAMA**, v. 324, n. 8, p. 782–793, 25 ago. 2020.
- WRAPP, D. et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 367, n. 6483, p. 1260–1263, 13 mar. 2020.
- WU, C. et al. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA Internal Medicine**, v. 180, n. 7, p. 934–943, 1 jul. 2020.
- WU, Z.; MCGOOGAN, J. M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. **JAMA**, v. 323, n. 13, p. 1239–1242, 7 abr. 2020.
- XIE, J. et al. Association Between Hypoxemia and Mortality in Patients With COVID-19. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 95, n. 6, p. 1138–1147, jun. 2020.
- XU, Z. et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 4, p. 420–422, 1 abr. 2020a.

XU, Z.-S. et al. Temporal profiling of plasma cytokines, chemokines and growth factors from mild, severe and fatal COVID-19 patients. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 100, 19 jun. 2020b.

YANG, L. et al. COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 128, 25 jul. 2020.

YAO, X. H. et al. A pathological report of three COVID-19 cases by minimal invasive autopsies. **Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi = Chinese Journal of Pathology**, v. 49, n. 5, p. 411–417, 8 maio 2020.

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

ZHANG, T.; SUN, L. X.; FENG, R. E. Comparison of clinical and pathological features between severe acute respiratory syndrome and coronavirus disease 2019. **Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi = Zhonghua Jiehe He Huxi Zazhi = Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases**, v. 43, n. 6, p. 496–502, 12 jun. 2020.

ZHAO, W. et al. Relation Between Chest CT Findings and Clinical Conditions of Coronavirus Disease (COVID-19) Pneumonia: A Multicenter Study. **AJR. American journal of roentgenology**, v. 214, n. 5, p. 1072–1077, maio 2020.

ZHOU, F. 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)**, v. 395, n. 10229, p. 1054–1062, 28 mar. 2020.

APÊNDICE A - MATERIAL COMPLEMENTAR

Lista de todos os marcadores biológicos, que analisamos os níveis de concentração sérica (pg/mL), de acordo com cada painel do Mapa MILLIPLEX®. (Total=74)

1 - Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A Magnetic Bead Panel (Total=47)	2 - Human Cardiovascular Disease (CVD) Magnetic Bead Panel 2 (Total=10)	3 - Human Angiogenesis/Growth Factor Magnetic Bead Panel 1 (Total=17)
sCD40L	ADAMTS13	EGF
IL-12 (p70)	D-DIMER	Angiopoietin-2
EGF	GDF-15	G-CSF
IL-13	Myoglobin	BMP-9
Eotaxin	sICAM-1	Endoglin
IL-15	MPO	Endothelin-1
FGF-2	P-SELECTIN	Leptin
IL-17A	lipocalin-2/NGAL	FGF-1
FLT-3L	sVCAM-1	Follistatin
IL-17E/IL-25	SAA	IL-8
Fractalkine	-	HGF
IL-17F	-	HB-EGF
G-CSF	-	PLGF
IL-18	-	VEGF-C
GM-CSF	-	VEGF-D
IL-22	-	FGF-2
GRO α	-	VEGF-A
IL-27	-	-
IFN α 2	-	-
IP-10	-	-
IFN γ	-	-
MCP-1	-	-
IL-1 α	-	-
MCP-3	-	-
IL-1 β	-	-
M-CSF	-	-
IL-1RA	-	-
MDC	-	-
IL-2	-	-
MIG	-	-
IL-3	-	-
MIP-1 α	-	-
IL-4	-	-

MIP-1 β	-	-
IL-5	-	-
PDGF-AA	-	-
IL-6	-	-
PDGF-AB/BB	-	-
IL-7	-	-
IL-8	-	-
TGF α	-	-
IL-9	-	-
TNF α	-	-
IL-10	-	-
TNF β	-	-
IL-12 (p40)	-	-
VEGF-A	-	-