AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS EM PACIENTES INTERNADOS COM COVID-19 NA 15ª REGIONAL DE SAÚDE DO PARANÁ

Vanderlei Rezende Júnior (PIBIC/CNPq/UEM), Felipe Aparecido Lacerda de Andrade (PIBIC/CNPq/UEM), Brenda Barroso Pelegrini, Letícia Nishi, Cristiane Maria Coli, Fernanda Ferreira Evangelista, Priscilla de Laet Sant'Ana (Co-Orientadora), Ana Lúcia Falavigna Guilherme (Orientadora). E-mail: alfalavignauem@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências da saúde / Farmácia.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; tempestade de citocinas; resposta imunológica.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil imunológico de pacientes com COVID-19 moderada a grave, internados no Hospital Universitário de Maringá (HUM). Foi realizada dosagem sérica das citocinas IL-10, IL-6 e IFNγ por meio da técnica de ELISA de captura, em duplicata, sendo estas citocinas descritas em outros estudos como grandes influenciadoras na modulação da tempestade de citocinas. Os pacientes foram divididos em dois grupos: internados em enfermaria com evolução para alta hospitalar (G2); internados em unidade de tratamento intensivo que evoluíram a óbito (G3); além de amostras negativas para COVID-19 (G1-controle) provenientes de doadores de sangue do Hemocentro Regional de Maringá. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o software GraphPad Prism versão 7.0. Foi observado um aumento de IL-6 e IL-10 em pacientes mais graves (G3). Em contrapartida, o IFNγ foi reduzido nestes pacientes. Deste modo, a dosagem sérica das citocinas IL-6 e IL-10 pode ser útil para avaliação do prognóstico de agravamento da COVID-19.

INTRODUÇÃO

A COVID-19 é uma infecção respiratória aguda causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, potencialmente grave e que possui elevadas taxas de transmissibilidade. A evolução da COVID-19 no paciente constitui de uma fase inicial de infecção, normalmente relacionada com a replicação viral nas vias aéreas e sintomas leves, podendo evoluir para uma fase pulmonar com envolvimento de uma resposta imunológica intensificada (ZANZA *et al.*, 2022). A gravidade desta doença está diretamente relacionada à tempestade de citocinas sendo caracterizada por aumento das interleucinas pró-inflamatórias IL-2, IL-7, IL-6, IL-17, Interferon-gama (INFγ) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-α), cujas ações culminam em uma resposta hiperinflamatória que gera danos teciduais no órgão atingido, majoritariamente no pulmão, podendo afetar outros órgãos como rim, fígado e coração, além de evoluir para coagulopatia (TANG *et al.*, 2020). Subsequentemente

ao aumento de citocinas pró-inflamatórias ocorre também o aumento de IL-10, uma interleucina com ação anti-inflamatória, com função de controlar a resposta e minimizar os danos teciduais (JOSE; MANUEL, 2020).
Portanto, a análise do perfil de citocinas em diferentes estágios clínicos de pacientes com COVID-19 é importante para ajudar a elucidar padrões imunológicos de pacientes que desenvolvem uma forma mais grave da doença, e assim, auxiliar na escolha da abordagem mais adequada de tratamento. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil das citocinas IL-10, IL-6 e IFNγ no sangue periférico de pacientes internados com diagnóstico confirmado para COVID-19.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de soro
Este trabalho faz parte de um projeto de pesquisa já submetido e aprovado no Comitê Permanente de Ética em Pesquisa (Copep/UEM) CAAE: 38443420.6.0000.0104. Todos os pacientes e/ou responsáveis e participantes da pesquisa foram convidados a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) autorizando a coleta e utilização do soro para as análises. As amostras de soro foram obtidas de pacientes internados no HUM com quadro respiratório e com diagnóstico positivo para COVID-19 por teste de RT-PCR durante o período de novembro de 2020 a fevereiro de 2021. Os pacientes foram divididos em dois grupos: internados na enfermaria com evolução para alta hospitalar (G2); internados em unidade de tratamento intensivo (UTI) que evoluíram a óbito (G3). Foram utilizados soros remanescentes que foram coletados para os exames de rotina, os quais são identificados com nome e número de prontuário do paciente e armazenados em freezer a -20°C para posterior dosagem de citocinas. Foram escolhidas amostras de soro coletadas em datas específicas em que o paciente apresentou uma piora de seu quadro clínico durante a internação. Foi incluído um grupo de amostras negativas para COVID-19 provenientes de doadores de sangue do Hemocentro do HUM/UEM, comprovadamente hígidos – grupo controle (G1).

Dosagem de Citocinas
Foi avaliado o perfil das citocinas IL-10 e IFNγ (Kit ELISA, Invitrogen), IL-6 (Kit ELISA, Elabscience) pela técnica de ELISA de captura, em duplicata, seguindo as orientações do fabricante. Foram utilizadas 20 amostras diferentes de soro de cada grupo. A leitura da placa foi realizada em leitor de placas de ELISA (Asys-Expert plus). Todos os dados foram analisados utilizando o teste “one-way ANOVA” pelosoftware GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os gráficos com a comparação das médias das concentrações séricas das citocinas IL-10, IL-6 e INFγ entre os grupos de pacientes avaliados estão representados na Figura 1. A concentração sérica (pg/mL) da citocina IL-10 foi significativamente maior

no grupo de pacientes internados na UTI que evoluíram a óbito (G3) (~20 pg/mL), em comparação com os outros grupos (Figura 1A). A IL-10 é uma citocina com atividade anti-inflamatória, sendo uma das principais citocinas com concentrações elevadas na tempestade de citocinas, com finalidade de minimizar os efeitos nocivos pró-inflamatórios observados na COVID-19 grave.

A citocina IL-6 teve um aumento exacerbado no grupo G3 (~85 pg/mL) em relação aos outros grupos, e G2 (~50 pg/mL) apresentou uma concentração significativamente superior a G1 (~20 pg/mL) (Figura 1B). Sendo assim, é possível observar um aumento proporcional da concentração de IL-6 com a gravidade da doença, que está relacionada ao processo inflamatório agudo exacerbado. Zanza *et al.* (2022), utilizaram a dosagem de IL-6 e IL-10 como marcadores da tempestade de citocinas, pelo fato de serem citocinas que apresentaram concentrações séricas significativamente distintas entre diferentes níveis de gravidade da doença.

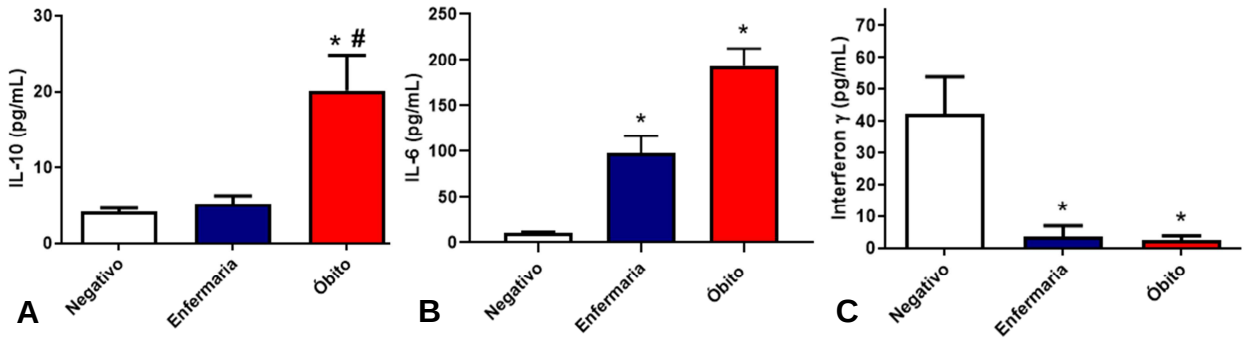

Figura 1 -Concentração (pg/mL) das intereucinas IL-10 (A), IL-6 (B) e INFy (C)no soro de pacientes com COVID-19 internados em enfermaria (G2), com COVID-19 internados em UTI que evoluíram a óbito (G3) e de pessoas saudáveis (G1-controle negativo).
*# Estatisticamente significante comparando entre os grupos ($p < 0,05$).
Fonte: Autor próprio, 2023.

Na tentativa da resposta imunológica de eliminar o vírus por meio da ativação da proliferação e diferenciação de células B e neutrófilos, há estimulo para a proliferação de linfócitos Th2, principais produtores de IL-6, aumentando ainda mais a produção de IL-6 e favorecendo o processo inflamatório, que na forma exacerbada causa danos teciduais no sistema respiratório e em outros tecidos (JOSE; MANUEL, 2020; TANG *et al*. 2020). Uma possível intervenção farmacológica seria a inibição específica desta citocina pró-inflamatória, com drogas como o tocilizumabe e sarilumabe que atuam como inibidores competitivos de IL-6 e podem ser úteis para o controle da inflamação na COVID-19 grave (ZANZA *et al*. 2022).

O IFNy, com a função de ativar macrófagos e linfócitos na resposta imunológica, foi mencionado em vários estudos por ser uma das citocinas pró-inflamatórias que também está em níveis séricos elevados na tempestade de citocinas. Em nosso estudo, entretanto, foi observada uma redução da concentração sérica de INFγ em casos graves em comparação com pacientes saudáveis (Figura 1C). Estes resultados divergem de outros estudos, como o de Pum *et al*. (2021), que

expressaram que o IFNγ está aumentado em casos graves da COVID-19. Luo *et al*. (2020), em concordância com nossa pesquisa, observou que IL-10 e IL-6 foram aumentados proporcionalmente à gravidade do quadro clínico, enquanto que a concentração de IFNγ foi reduzida em casos graves. A ação da IL-10 na inibição da resposta Th1 pode estar relacionada à redução dos níveis séricos de INFγ.

CONCLUSÕES

O estudo demonstrou um aumento nas concentrações séricas de IL-6 e IL-10, proporcional à gravidade clínica dos pacientes com COVID-19. Sendo assim, as concentrações dessas duas citocinas podem ser usadas como importantes marcadores prognósticos da evolução clínica da doença, além da IL-6 ser um possível alvo terapêutico no tratamento do processo hiperinflamatório da COVID-19. Já o IFNγ apresentou concentrações discrepantes em alguns estudos, de forma que não se apresenta como um marcador confiável da tempestade de citocinas.

AGRADECIMENTOS

À UEM / CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

REFERÊNCIAS

JOSE, R. J.; MANUEL, A. COVID-19 cytokine storm: the interplay between inflammation and coagulation. **The Lancet. Respiratory Medicine**, v. 8, n. 6, p. 46-47, 2020.

LUO, W.; ZHANG, J.W.; ZHANG, W. *et al*. Circulating levels of IL-2, IL-4, TNF-α, IFN-γ, and C-reactive protein are not associated with severity of COVID-19 symptoms. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 1, p. 89-91, 2021.

PUM, A.; ENNEMOSER, M.; ADAGE, T. *et al*. Cytokines and Chemokines in SARS-CoV-2 Infections-Therapeutic Strategies Targeting Cytokine Storm. **Biomolecules**, v. 11, n. 1, p. 91, 2021.

TANG, L.; YIN, Z.; HU, Y. *et al*. Controlling Cytokine Storm is Vital in COVID-19. **Frontiers in immunology**, v. 11, 570993, 2020.

ZANZA, C.; ROMENSKAYA, T.; MANETTI, A.C. *et al*. Cytokine Storm in COVID-19: Immunopathogenesis and Therapy. **Medicina (Kaunas)**, v. 58, n. 2, p.144, 2022.