

## **AVALIAÇÃO DE FIBROSE EM TECIDO PULMONAR DE PACIENTES QUE FORAM A ÓBITO COM COVID-19 POR MEIO DA TÉCNICA DE PICTRO SIRIUS RED**

Ana Beatriz Golfeto (PIC/UEM), Ana Júlia Kimi Basílio (PIC/UEM); Willian Junior da Silva Meneguete; Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tania Cristina Alexandrino Becker (Co-orientadora); Prof<sup>ª</sup>Dr<sup>ª</sup>. Priscilla de Laet Sant'ana (Orientadora). E-mail: plsamariano2@uem.br.

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

### **Medicina / Anatomia Patológica e Patologia Clínica**

**Palavras-chave:** SARS-CoV-2; Colágeno III; Histopatologia.

### **RESUMO**

A fibrose pulmonar, um dos desfechos em casos graves de COVID-19 com Síndrome da Angústia Respiratória Aguda, aumenta os riscos de complicações e mortalidade. Investigações pós-morte são essenciais para entender o padrão de deposição de matriz extracelular induzido pelo SARS-CoV-2, auxiliando no tratamento e prognóstico. Assim, objetiva-se analisar a deposição de colágeno tipo I (Col-I) e tipo III (Col-III) em tecidos pulmonares de pacientes que faleceram por COVID-19 grave, utilizando a técnica de Picrosirius Red. Para isso, amostras foram coletadas por autópsia minimamente invasiva de 18 pacientes que foram a óbito com COVID-19, e coradas com Hematoxilina-eosina e Picrosirius Red. Análise microscópica e quantificação de Col-I e Col-III foram realizadas. Todas as amostras mostraram Col-III, com percentual médio de 0,0037%. Notou-se que houve maior expressão de Col-III em pacientes com tempo prolongado de internação, necessidade de ventilação mecânica, estágios avançados de dano alveolar difuso e intensa proliferação de pneumócitos. Entretanto, idade e tabagismo não influenciaram a deposição de matriz extracelular. Assim concluiu-se que pacientes com maior deposição de Col-III estavam em estágios avançados da doença e tempo prolongado de hospitalização.

### **INTRODUÇÃO**

O SARS-COV-2, RNA vírus, foi responsável pela pandemia de COVID-19. Após a infecção, a doença pode se desenvolver com uma variedade de quadros clínicos, podendo ser assintomático, com sintomas leves como cefaleia, ou ainda graves e

consequente hospitalização devido a Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA). A SARA anteriormente foi correlacionada com quadros de fibrose pulmonar (FP), que é um estado patológico em que o parênquima pulmonar, como uma medida de recuperação da lesão tecidual, sofre um processo de comprometimento funcional irreversível muitas vezes atribuído ao excesso de deposição de componentes da matriz extracelular (MEC), principalmente por proliferação ativa de colágeno. Uma variedade de causas pode ativar uma cascata pró fibrótica, e a COVID-19 parece ser um desses fatores (COSTA *et al.*, 2023; CIRJALIU *et al.*, 2023). Dessa maneira, a análise do padrão morfológico da fibrose, através da distinção dos subtipos de colágeno é uma ferramenta para o entendimento da FP em pacientes com COVID-19 grave e suas possíveis sequelas. Uma vez que, o colágeno tipo III (Col-III) pressupõe uma indução fibrótica recente, enquanto o colágeno tipo I (Col-I) a progressão da fibrose e a reorganização do tecido tardiamente (GUL *et al.*, 2023; MAUAD, *et al.*, 2021).

## MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de tecido pulmonar foram coletadas de 18 pacientes que foram a óbito por COVID 19 após um período de internamento em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) no Hospital Universitário de Maringá (HUM) entre março e novembro de 2020. A coleta e pesquisa ocorreram de acordo com as normas éticas e aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa – COPEP/UEM (CAAE: 38443420.6.0000.0104). As coletas foram realizadas por meio de procedimento de autópsia minimamente invasiva (AMI), utilizando-se uma agulha cortante (Trucut), guiada por ultrassom, e em seguida, é realizada uma punção. As amostras foram processadas, cortadas em micrótomo e coradas com Hematoxilina-eosina e Picrosirius Red (PSR) para a visualização de fibras de Col-I e Col-III no tecido pulmonar de pacientes com diagnóstico histopatológico de dano alveolar difuso (DAD) em fase proliferativa e fibrótica. As lâminas foram analisadas em um microscópio de luz polarizada (Opticam microscopy technology 0500R), acoplado a um analisador de imagem. A análise qualitativa da polarização foi realizada ao angular o filtro polarizador a 90°, seguida da visualização da birrefringência amarelo-esverdeada (Col-III) ou vermelho-alaranjada (Col-I). Para a quantificação do Col-I e Col-III realizou-se a captura de 10 fotomicrografias por lâmina, de áreas selecionadas aleatoriamente no parênquima pulmonar, com aumento de 200x, por meio de câmera acoplada (OPTHD – Opticam microscopy technology). As imagens foram analisadas através do software ImageProPlus 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Inc) estabelecendo-se uma porcentagem de pixels de Col-III (amarelo-esverdeado) em comparação aos pixels totais observados na lâmina corada por PSR. Um modelo de

regressão linear simples com um método de seleção Stepwise foi usado para identificar covariáveis capazes de influenciar o aumento ou diminuição da porcentagem de Col-III no pulmão. As covariáveis consideradas no modelo foram “idade”, “tempo de hospitalização (dias)”, “estágio de DAD”, “histórico de tabagismo” e “fibrose”. Adicionalmente, as alterações histopatológicas mais frequentemente observadas através da coloração de H&E também foram comparadas com o percentual de Col-III (GIACOMELLI *et al.*, 2021; GUL *et al.*, 2021).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise das lâminas, foi encontrado Col-III em todas as amostras, com uma porcentagem estimada de 0,0037%. As variáveis “tempo de internação” e “hiperplasia de pneumócitos” foram significativas ( $p < 0,05$ ) e diretamente relacionadas ao aumento da porcentagem de Col-III (Tab. 1). O tempo médio de hospitalização foi de 17,8 dias, sendo que 72% dos pacientes tiveram uma internação de 14 dias ou mais. Esse prolongado período de internação pode explicar a alta prevalência de sequelas pulmonares em sobreviventes da COVID-19, especialmente aqueles com internações mais longas. Grande parte dos pacientes passou por intubação orotraqueal (IOT) e 88,4% estavam sob ventilação mecânica, o que corrobora os achados histopatológicos de DAD proliferativa e avançada.

**Tabela 1.** Estimativas do modelo de regressão linear simples aplicado ao percentual de colágeno tipo III nos pulmões de pacientes que faleceram por COVID-19 no Hospital Regional de Maringá (HUEM)

Variáveis	Estimativa	Desviopadrão	Estatística t	Valor P
(Intercepto)	0.0040	0.0015	2.6	0.0174
Tempo de hospitalização (dias)	0.0001	0.0000	3.4	0.0037
Membrana Hialina	0.0008	0.0004	2.1	0.0511
Hiperplasia de pneumócitos	-0.0019	0.0008	-2.6	0.0210

Significância estatística  $p < 0,05$ ; \*\* Significância estatística  $p < 0,1$

As variáveis idade, sexo e histórico de tabagismo não influenciaram a porcentagem de Col-III, refletindo que o aumento do colágeno está mais relacionado ao estágio do

DAD e ao tempo de hospitalização. Comparando com pacientes que sofreram de outras causas de SARA, os pacientes com COVID-19 apresentaram maior deposição de colágeno pulmonar. Isso pode estar associado à expressão precoce de TGF- $\beta$  nos pulmões, seguida por uma deposição intensa e desorganizada de MEC, impulsionada pelo uso prolongado de ventilação mecânica (COSTA *et al.*, 2023). Esse perfil fisiopatológico pode, em parte, explicar a maior morbidade e mortalidade da COVID-19 em comparação com outras pneumonias virais, bem como a alta prevalência de sequelas pulmonares, como dispneia e capacidade pulmonar reduzida em sobreviventes.

## CONCLUSÕES

Conclui-se que os níveis elevados de colágeno tipo III estavam correlacionados com um maior tempo de internação hospitalar e maior duração dos sintomas, particularmente em pacientes que passaram por ventilação mecânica prolongada. Embora fatores como idade e histórico de tabagismo tenham sido avaliados, eles não se mostraram determinantes na indução de síntese do Col-III.

## REFERÊNCIAS

COSTA, N.; *et al.* COVID-19 induces more pronounced extracellular matrix deposition than other causes of ARDS. **Respiratory Research**, v. 24, n. 1, p. 281, 2023.

CIRJALIU, R. E.; *et al.* Clinicopathological Outlines of Post-COVID-19 Pulmonary Fibrosis Compared with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Biomedicines**, v. 11, n. 6, 2023.

GUL, A.; *et al.* Pulmonary fibrosis model of mice induced by different administration methods of bleomycin. **BMC Pulmonary Medicine**, [s. l.], n. 91, ed. 23, 2023.

MAUAD, T.; *et al.* Tracking the time course of pathological patterns of lung injury in severe COVID-19. **Respiratory Research**, v. 22, n. 1, p. 32, 2021.