



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE  
TECNOLOGIA



**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**“BIOMARCADORES DE GRAVIDADE DA COVID-19”**

**Rafael Luís Luporini**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

***Orientadores:***

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda de Freitas Anibal

Prof. Dr. Henrique Pott Júnior

**São Carlos - SP  
2022**

Rafael Luís Luporini

**“BIOMARCADORES DE GRAVIDADE DA COVID-19”**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

***Orientadores:***

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda de Freitas Anibal  
Prof. Dr. Henrique Pott Júnior

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal  
Departamento de Morfologia e Patologia – UFSCar

Profa. Dra. Sigrid de Sousa dos Santos  
Departamento de Medicina - UFSCar

Profa. Dra. Meliza Goi Roscani  
Departamento de Medicina - UFSCar

Prof. Dr. Rafael Machado Rezende  
Harvard Medical School – EUA

Prof. Dr. Fernando Bellissimo Rodrigues  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto -USP

São Carlos

2022

Luporini, Rafael Luís

Biomarcadores de gravidade da COVID-19 / Rafael Luís  
Luporini -- 2022.  
93f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos,  
campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Fernanda de Freitas Anibal

Banca Examinadora: Fernanda de Freitas Anibal, Sigrid  
de Sousa dos Santos, Meliza Goi Roscani, Rafael  
Machado Rezende, Fernando Bellissimo Rodrigues

Bibliografia

1. COVID-19. 2. Citocinas inflamatórias. 3.  
Metabolômica. I. Luporini, Rafael Luís. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática  
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

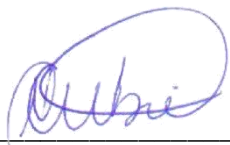
Bibliotecário responsável: Ronildo Santos Prado - CRB/8 7325

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Folha de aprovação**

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Doutorado do candidato Rafael Luís Luporini realizada em 28/04/2022:



---

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal  
Departamento de Morfologia e Patologia – UFSCar

---

Profa. Dra. Sigrid de Sousa dos Santos  
Departamento de Medicina - UFSCar

---

Profa. Dra. Meliza Goi Roscani  
Departamento de Medicina - UFSCar

---

Prof. Dr. Rafael Machado Rezende  
Harvard Medical School – EUA

---

Prof. Dr. Fernando Bellissimo Rodrigues  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto -USP

**DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho a minha família que me deu todo suporte emocional e espiritual em todos os momentos até hoje!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que me permitiram chegar até esse momento:

Ao meu pai, que me presenteou com a vida e durante sua vida me ensinou com seu exemplo a agir sempre de forma justa e honesta.

A minha mãe, que com a sua forma de amar me ensinou a viver pelos outros.

A minha esposa Luciana, que com todo seu amor me ensinou a me amar.

Aos meus filhos, Felipe e Henrique, que cada um na sua forma de agir, amar e aprontar me ensinam a tentar extrair o melhor de mim. E ao bebê que logo menos estará nos alegrando.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos, que sempre foram, junto com meus pais, o porto seguro em todas as tempestades.

A minha sogra, sogro e cunhados, que com seus exemplos de fé e luta me ensinaram a acreditar mais.

Aos meus amigos, que sempre estão a postos para curtir os momentos de diversão e acolher nos momentos de necessidade.

A todos os professores e preceptores que me transmitiram seus conhecimentos e exemplos ao longo da vida, vocês foram essenciais para eu chegar até aqui.

Aos meus alunos e residentes que me fazem ter certeza de que escolhi o caminho certo.

As minhas secretárias Marley e Bruna, que conseguiram me ajudar a organizar minha vida para continuar sendo médico, mesmo com todas as disciplinas, pesquisas e preparos do doutorado.

Aos pacientes, que voluntariamente contribuíram com esta pesquisa, permitindo assim que a ciência possa continuar avançando e contribuindo com a melhoria do cuidado à saúde humana.

Às diversas pessoas que sofreram com a COVID-19, seja adoecendo, seja perdendo alguém querido. Que esse trabalho possa contribuir na assistência de casos futuros.

A todos do Hospital Universitário, que se doaram cuidando, com todo seu amor e competência, dos pacientes convalescentes de COVID-19.

A todos do PPGBiotec (professores, Cláudia, coordenadores e ex-coordenadores e colegas de pós-graduação) pelo convívio, mesmo que virtual.

A Dr<sup>a</sup>. Ignez por toda confiança e estímulo.

A Dr<sup>a</sup>. Joyce, que tanto me ensinou e orientou no mundo da citometria.

Ao Dr. Giba e Dr<sup>a</sup>. Maria Carolina, que me apresentaram o gigante mundo da metabólica.

A Dr<sup>a</sup>. Marcia Cominetti, que me abriu as portas de seu laboratório de forma altruísta.

A Dr<sup>a</sup>. Meliza, Dr<sup>a</sup>. Silvana Chachá e Dr<sup>a</sup>. Sigrid, que sempre me incentivaram a tomar o leme dessa jornada chamada pós-graduação.

Aos professores das bancas examinadoras de meu pedido de doutorado direto, qualificação e defesa desta tese pela disponibilidade e valiosas contribuições.

A minha orientadora que, na sua forma de cuidar dos meus passos no aprendizado científico, tornou-se uma grande amiga e exemplo.

Ao meu coorientador, que me mostrou que um cirurgião pode ser um cientista.

A Deus, que sem Ele, nada teria sentido.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) –Código de Financiamento 001 / Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Processo No 302105/2019-0 / Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) -Processo No 2021/01306-2 e Petróleo Brasileiro S.A. (PETROBRAS) -Processo No 2017/0001-0

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 00 / National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) -Process No 302105/2019-0 / São Paulo Research Foundation (FAPESP) -Process No 2021/01306-2 / Petróleo Brasileiro S.A. (PETROBRAS) -Process No 2017/0001-0

Luporini, Rafael Luís; “**BIOMARCADORES DE GRAVIDADE DA COVID-19**”. 2022. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2022

## **RESUMO**

A doença do coronavírus 2019 (COVID-19), causada pelo vírus SARS-CoV-2, alcançou o status de pandemia em 2020, transformando-se em um grande problema de saúde mundial. A COVID-19 apresenta um grande espectro de manifestações, podendo cursar desde formas assintomáticas até formas graves como síndrome do desconforto respiratório agudo, tempestade de citocinas e óbito. Dadas a magnitude, a mortalidade e a morbidade atingidas nos últimos dois anos pela COVID-19, este estudo teve o objetivo de identificar em pacientes com COVID-19 biomarcadores que estabeleçam relação com a gravidade da doença na admissão hospitalar. Dentre estes biomarcadores estão citocinas inflamatórias, transaminases hepáticas e metabólitos analisados pela metabolômica. A presente pesquisa trata-se de um estudo transversal unicêntrico, realizado no HU-UFSCar (Hospital Universitário da Universidade Federal de São Carlos). Informações clínicas, etárias, sociodemográficas, dados de comorbidades e de gravidade de pacientes adultos internados com COVID-19 foram analisados. Amostras de sangue foram coletadas até 12h após admissão hospitalar. Foram realizadas análises bioquímicas gerais, citometria de fluxo (para citocinas inflamatórias IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e metabolômica por ressonância nuclear magnética para diversos metabólitos, dentre eles a fenilalanina. Após análise estatística nossos resultados demonstraram que: 1) idosos com COVID-19 apresentam níveis mais elevados de IL-6 e IL-10 em comparação ao grupo de adultos, estando essa diferença associada à gravidade da doença e, no grupo de idosos, a índices maiores de comorbidades. 2) As transaminases hepáticas são marcadores de gravidade da COVID-19, estando a IL-2 associada às elevações limítrofes das transaminases, enquanto a IL-10 associada às elevações moderadas a graves. 3) Fenilalanina é marcador de gravidade para COVID-19 independente das citocinas inflamatórias. Dessa forma, foi possível estabelecer biomarcadores associados à gravidade de pacientes adultos com COVID-19 e assim, contribuir na análise da gravidade dos quadros de COVID-19 e auxiliar nas decisões de condução dos casos pelas equipes de saúde em ambiente hospitalar.

**Palavras-chave:** COVID-19, biomarcadores, citocinas inflamatórias, metabolômica, transaminases, fenilalanina, gravidade, tempestade de citocinas.



Luporini, Rafael Luís. **“BIOMARKERS OF COVID-19 SEVERITY.”** 2022.

Dissertation (Postgraduate Program in Biotechnology) – UFSCar, São Carlos, 2022.

## **ABSTRACT**

Coronavirus disease 2019 (COVID-19), caused by the SARS-CoV-2 virus, reached pandemic status in 2020, becoming a major global health problem. COVID-19 has a wide spectrum of manifestations, ranging from asymptomatic forms to severe forms such as acute respiratory distress syndrome, cytokine storm and death. Given the magnitude, mortality and morbidity affected in the last two years by COVID-19, this study aimed to identify biomarkers in patients with COVID-19 that establish a relationship with the severity of the disease at hospital admission. Among these biomarkers are inflammatory cytokines, hepatic transaminases and metabolites analyzed by metabolomics. The present research is a unicentric cross-sectional study, conducted at the HU-UFSCar. Clinical, age, sociodemographic, comorbidity and severity data from adult patients hospitalized with COVID-19 were analyzed. Blood samples were collected up to 12 hours after hospital admission. General biochemical analysis, flow cytometry (for inflammatory cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) and metabolomics by magnetic nuclear resonance were performed for several metabolites, including phenylalanine. After statistical analysis, our results showed that: 1) elderly people with COVID-19 have higher levels of IL-6 and IL-10 compared to the adult group, this difference being associated with the severity of the disease and, in the elderly group, the higher rates of comorbidities. 2) Liver transaminases are markers of COVID-19 severity, with IL-2 associated with borderline transaminase elevations, while IL-10 associated with moderate to severe elevations. 3) Phenylalanine is a severity marker for COVID-19 independent of inflammatory cytokines. In this way, it was possible to establish biomarkers associated with the severity of adult patients with COVID-19 and, thus, to contribute to the analysis of the severity of COVID-19 cases and to assist in the decisions on how to manage cases by health teams in a hospital environment.

**Keywords:** COVID-19, biomarkers, inflammatory cytokines, metabolomics, transaminases, phenylalanine, severity, cytokine storm.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>página</b>
<b>Capítulo 1 – Introdução</b>	
<b>Figura 1</b> Espectro clínico (A) e imunológico (B) da COVID-19	16
<b>Capítulo 2 – Materiais e Métodos</b>	
<b>Figura 2</b> Princípios da citometria de fluxo	20
<b>Figura 3. 1</b> Primeira página do artigo “IL-6 and IL-10 are associated with Disease severity and higher comorbidity in adults with COVID-19”	30
<b>Figura 3. 2</b> Probabilidade cumulativa e distribuição em violino de (A) IL-6 (log pg/mL) e (B) IL-10 (log pg/mL) mensuradas de acordo com o grupo etário	34
<b>Figura 3. 3</b> Primeira página do artigo “: Elevations in Liver Transaminases in COVID-19: (How) Are They Related?”	40
<b>Figura 3. 4</b> Relação entre a elevação das transaminases hepáticas e marcadores inflamatórios em pacientes adultos com COVID-19	45
<b>Figura 3. 5</b> Gráfico de distribuição de Jitter de (A) Escore de NEWS2 na admissão hospitalar e (B) IL-10 (log pg/mL) medidos de acordo com o grupo de transaminases	46
<b>Figura 3. 6</b> Primeira página do artigo “Phenylalanine and COVID-19: Tracking Disease severity markers”	50
<b>Figura 3. 7</b> Distribuição dos níveis séricos de fenilalanina de acordo com o tempo de início da doença até a internação e gravidade da doença.	57

## LISTA DE TABELAS

	<b>página</b>
<b>Capítulo 3 – Resultados e Discussão</b>	
<b>Tabela 3. 1</b> Características basais da coorte	32
<b>Tabela 3. 2</b> Nível de citocinas de acordo com os grupos etários	33
<b>Tabela 3. 3</b> Modelo de regressão linear para associação das características clínicas e gravidade da doença com os níveis séricos de IL-6 (log pg/mL) e IL-10 (log pg/mL)	35
<b>Tabela 3. 4</b> Modelo de regressão linear para associação da interação entre idade e ICC com os níveis séricos de IL-6 (log pg/mL)	36
<b>Tabela 3. 5</b> Características basais da coorte	42
<b>Tabela 3. 6</b> Características das elevações das transaminases hepáticas	44
<b>Tabela 3. 7</b> Características basais dos sujeitos envolvidos	52
<b>Tabela 3. 8</b> Fenilalanina e outros parâmetros laboratoriais na admissão hospitalar, de acordo com o grupo de gravidade	54
<b>Tabela 3. 9</b> Modelos de regressão linear para a associação entre níveis séricos de fenilalanina e marcadores inflamatórios, ajustados para sexo, idade, comorbidade (ICC) e grupos de gravidade	556

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

µg	Micrograma
µL	Microlitro
ALT	Alanina Aminotransferase
APACHE	Avaliação da Fisiologia Aguda e da Saúde Crônica
AQ	Tempo de Aquisição
AST	Aspartato Aminotransferase
COVID-19	Doença do Coronavírus 2019
d1	Tempo de Espera Entre Cada Aquisição
D2O	Óxido de deutério
dL	Decilitro
DMP	Departamento de Morfologia e Patologia
EBA	Ensaio Baseado em Células
ECA-2	Enzima Conversora de Angiotensina-2
ECF	Escala Clínica de Fragilidade
EUA	Estados Unidos da América
FMO	Falência múltipla de órgãos
g	Grama
HDO	Hidrodessoxigenação
HU-UFSCar	Hospital Universitário da Universidade Federal de São Carlos
Hz	Hertz
ICC	Índice de comorbidade de Charlson
IFN- γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IL-2	Interleucina 2
IL-2R	Interleucina 2r
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
K	Kelvin
KDA	Quilodalton
L	Litro
Lb	Fator de multiplicação exponencial
LIDI	Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas

LPA	Lesão pulmonar aguda
LSN	Limite superior da normalidade
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mMOL	Milimol
N/L	Neutrófilos/Linfócitos
NEWS2	<i>National Early Warning Score 2</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
ns	Número de promediações
°C	Graus Celcius
OMS	Organização Mundial de Saúde
p1	Duração do pulso de radiofrequência
PCR	Proteína C reativa
pg	Picograma
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SOFA	Avaliação da insuficiência orgânica relacionada à sepse
SPO <sub>2</sub>	Saturação periférica de oxigênio
SWH	Janela espectral em Hertz
TMSP-D4	Trimetilsililpropionato de sódio deuterado
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- alfa
TRNA	Ácido Ribonucléico Transportador
TSP-D4	Sal De Sódio Do Ácido Trimetilsililpropanóico-D4
UFSCar	Universidade Federal De São Carlos
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

## Sumário

<b>RESUMO</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>11</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>12</b>
<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1 - A COVID-19</b> .....	<b>16</b>
<b>1.2 - A COVID-19 e o sistema gastrointestinal</b> .....	<b>17</b>
<b>1.3 - A COVID-19 e os marcadores de gravidade</b> .....	<b>18</b>
<b>1.4 - A COVID-19, inflamação e interleucinas inflamatórias</b> .....	<b>19</b>
<b>1.5 - A COVID-19 em idosos (<i>inflammaging</i> e imunossenescência)</b> .....	<b>21</b>
<b>1.6 – Justificativa</b> .....	<b>21</b>
<b>1.7 – Objetivos</b> .....	<b>22</b>
<b>1.7.1 – Gerais:</b> .....	<b>22</b>
<b>1.7.2 – Específicos:</b> .....	<b>22</b>
<b>2- CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1 – Desenho e local de realização do estudo</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2 – Critérios de inclusão / recrutamento</b> .....	<b>23</b>
<b>2.3 – Critérios de exclusão</b> .....	<b>23</b>
<b>2.4 – Preceitos éticos</b> .....	<b>23</b>
<b>2.5 - Avaliações de estudo</b> .....	<b>24</b>
<b>2.6 - Exames laboratoriais</b> .....	<b>26</b>
<b>2.7 - Marcadores sistêmicos de inflamação / citometria de fluxo</b> .....	<b>26</b>
<b>2.8 – Metabolômica</b> .....	<b>27</b>
<b>2.8.1 - Preparação de amostra de soro para medições de RNM</b> .....	<b>27</b>
<b>2.8.2 - Aquisição de espectro e quantificação de metabólitos</b> .....	<b>27</b>
<b>2.9 - Avaliação das transaminases hepáticas</b> .....	<b>28</b>
<b>2.10 - Grupos para análise dos dados:</b> .....	<b>28</b>
<b>2.11 - Análise estatística</b> .....	<b>29</b>
<b>2.11.1 – Avaliação das interleucinas inflamatórias em relação à idade (adultos e idosos) e às interferências das comorbidades e gravidade.</b> .....	<b>29</b>
<b>2.11.2 - Avaliação dos dados clínicos e de gravidade obtidos baseados nas transaminases hepáticas (normais, limítrofe e &gt;2x LSN)</b> .....	<b>29</b>
<b>2.11.3 - Avaliação de dados da metabolômica (entre eles, citocinas inflamatórias e fenilalanina) comparativamente entre pacientes leves, moderados e graves).</b> .....	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>31</b>

<b>3.1 - Artigo 1:</b> “IL-6 e IL-10 estão associadas com a gravidade da doença e com maior número de comorbidades em idosos com COVID-19” .....	31
(Original: <i>IL-6 and IL-10 are associated with Disease severity and higher comorbidity in adults with COVID-19</i> ). Figura 1. ....	31
<b>3.1.1 - Resultados:</b> .....	32
<b>3.1.2 - Discussão</b> .....	38
<b>3.2 - Artigo 2:</b> “Elevação das transaminases hepáticas na COVID-19: (Como) elas estão relacionadas?” .....	41
(Original: <i>Elevations in Liver Transaminases in COVID-19: (How) Are They Related?</i> ). (Pott-Junior et al., 2021) Figura 3.3 .....	41
<b>3.2.1 - Resultados:</b> .....	42
<b>3.2.2 - Discussão</b> .....	48
<b>3.3 - Artigo 3:</b> “Fenilalanina e COVID-19: rastreando marcadores de gravidade”	
(Original: <i>Phenylalanine and COVID-19: Tracking Disease severity markers</i> ).....	52
<b>3.3.1 - Resultados:</b> .....	53
<b>3.3.2. Discussão</b> .....	60
<b>CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES</b> .....	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>65</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>76</b>
<b>Anexo 1 – Índice de Comorbidade de Charlson</b> .....	76
<b>Anexo 2 – Classificação de Gravidade da Doença COVID-19</b> .....	78
<b>Anexo 3- National Early Warnig Score 2 (NEWS2)</b> .....	79
<b>Anexo 4 – SOFA – Avaliação da Insuficiência Orgânica Relacionada à Sepse</b> .80	
<b>Anexo 5 – Escala Clínica de Fragilidade</b> .....	81
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>82</b>
<b>Apêndice 1- Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSCar</b> .....	83
<b>Apêndice 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido</b> .....	88
<b>Apêndice 3 - Protocolo de extração de dados</b> .....	91

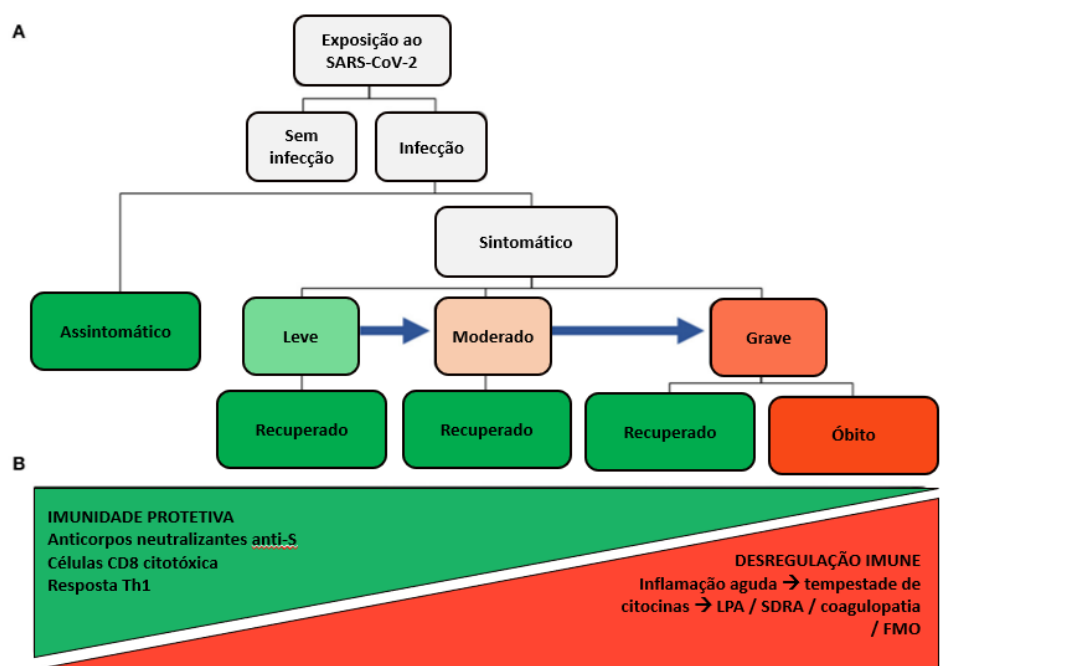
## Capítulo 1 - Introdução

### 1.1 - A COVID-19

Em março de 2020, a doença causada pelo novo coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), a doença denominada coronavírus 2019 (COVID-19) alcançou o status de pandemia, transformando-a em um grande problema de saúde mundial. (Miller et al., 2020; Sohrabi et al., 2020)

A infecção pelo SARS-CoV-2 pode ser assintomática ou pode estar associada à doença COVID-19, podendo apresentar uma grande variedade de sintomas respiratórios [tosse seca, dispneia, pneumonia, edema pulmonar, lesão pulmonar aguda (LPA), síndrome do desconforto respiratório aguda (SDRA)] e sistêmicos (febre) (Guan et al., 2020), evoluindo eventualmente para quadros mais graves com falência múltipla de órgãos (FMO), podendo evoluir a óbito. (Figura 1) (D'Amico et al., 2020) Sintomas menos comuns são: cefaleia, hemoptise, e sintomas gastrointestinais, como náusea, vômito, diarreia, dor abdominal e hiporexia. (D'Amico et al., 2020; Mao et al., 2020)

**Figura 1** - Espectro clínico (A) e imunológico (B) da COVID-19



(Garcia, 2020)

Fonte: Adaptado de Garcia, 2020



Dependendo da cepa ou do *status* vacinal, até 20% dos pacientes com COVID-19 desenvolvem uma doença hipoxêmica inflamatória grave que se assemelha a uma tempestade de citocinas caracterizada pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias como Interleucina-1 (IL-1), IL-6 e fator de necrose tumoral- alfa (TNF- $\alpha$ ). (Blanco-Melo et al., 2020)

### **1.2 - A COVID-19 e o sistema gastrointestinal**

Os sintomas gastrointestinais ocorrem em mais de 15% dos infectados e são atribuídos à invasão de enterócitos mediada pelos receptores da enzima conversora de angiotensina-2 (ECA-2). (Guan et al., 2020; Xiao et al., 2020)

Sintomas gastrointestinais podem ser a manifestação única da COVID-19. (Monkemüller et al., 2020) A taxa média de diarreia apresentada em pacientes com COVID-19 é de 10,4%, sendo maior em pacientes mais graves. Também foi evidenciado que paciente com sintomas gastrointestinais foram mais propensos a evoluir com SDRA e necessitar de ventilação mecânica. (D'Amico et al., 2020) A ocorrência de sintomas digestivos foi de 15%, sendo náuseas e vômitos 7%, diarreia 9% e dor abdominal 3%. (Mao et al., 2020)

Apesar de não compreendido de forma adequada, o acometimento do fígado com elevação de suas enzimas tem sido descrito em 14 a 53% dos casos de COVID-19. (Jothimani et al., 2020; Kullar et al., 2020; Y. Li & Xiao, 2020; Portincasa et al., 2020; Tian & Ye, 2020) Alguns mecanismos possíveis são descritos, entre eles: inflamação mediada pelo sistema imune; efeito citotóxico direto devido à replicação viral nos hepatócitos; lesão hepática induzida pelas medicações utilizadas para o tratamento da COVID-19 (exemplos: remdesivir, tocilizumab, cloroquina) e reativação de doenças hepáticas previamente existentes. (Ali, 2020; Marjot et al., 2021)

Diversos estudos demonstram que as anormalidades na bioquímica hepática são mais frequentes em casos graves de COVID-19 quando comparados a casos leves e moderados. (Mao et al., 2020; Yip et al., 2021) Também se demonstrou que anormalidades nas enzimas hepáticas estão associadas ao pior prognóstico e maior mortalidade. (Ali & Hossain, 2020; Ding

et al., 2021; Jothimani et al., 2020; Magro et al., 2020; Tian & Ye, 2020; Wu et al., 2020, 2021; Xiao et al., 2020; Zhong et al., 2020)

### **1.3 - A COVID-19 e os marcadores de gravidade**

Como já descrito, a COVID-19 apresenta um grande espectro de manifestações clínicas, desde assintomáticas e leves sintomas de resfriado, até sintomas de pneumonia grave com SDRA e morte. (Ramos-Casals et al., 2021) Os graus variados de gravidade refletem diferentes achados clínicos e laboratoriais, além de diferentes respostas a terapias e evoluções clínicas. (Siddiqi & Mehra, 2020) A revisão sistemática de Izcovich e colaboradores (Izcovich et al., 2020) aponta perto de 50 marcadores em 207 estudos que podem prover informações prognósticas valiosas sobre a gravidade e/ou mortalidade da doença. Esses marcadores não são específicos para COVID-19 e demonstram similaridades em relação a outras condições.

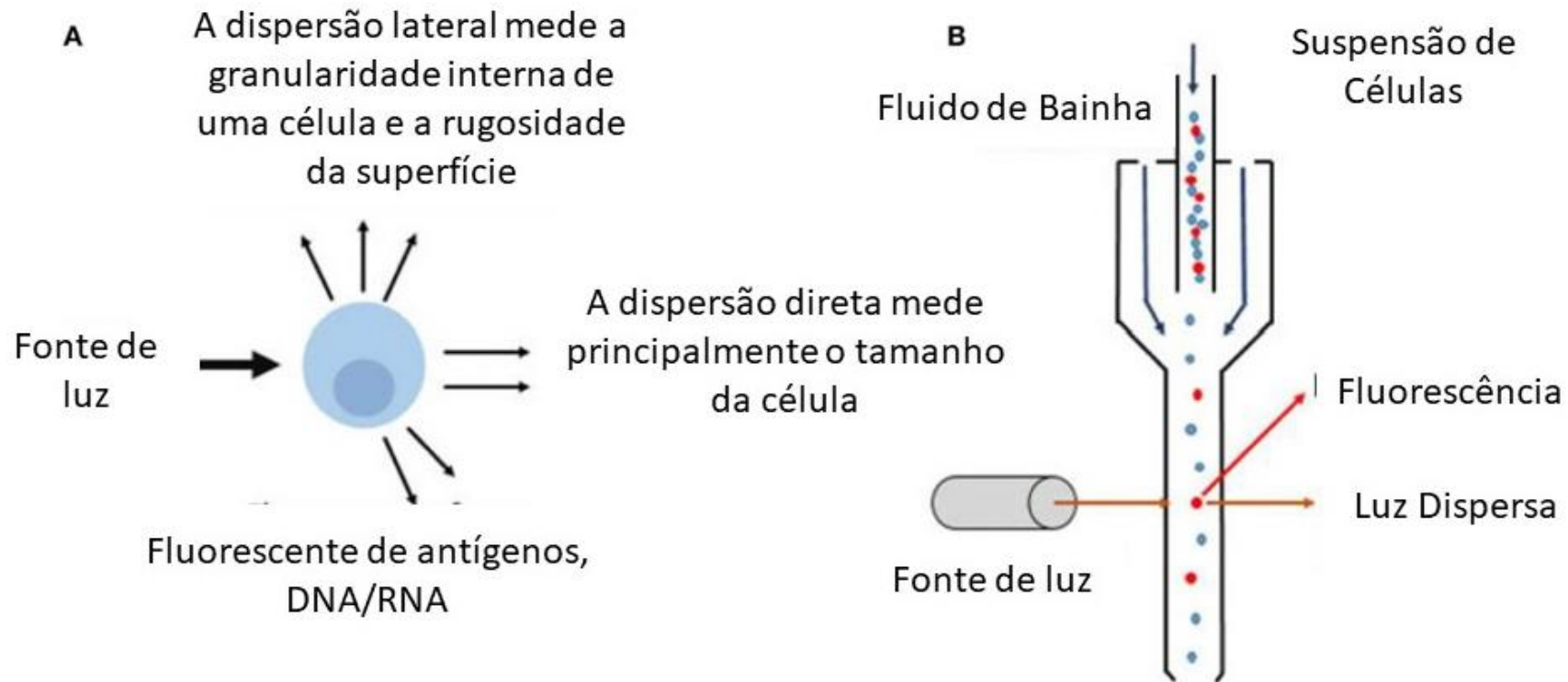
Recentemente, poucos estudos têm mostrado a existência de metabólitos clinicamente significantes que possam interferir na gravidade e prognóstico da COVID-19. (Y. Chen et al., 2020; Shi et al., 2021; Song et al., 2020) Estudos metabolômicos podem prover um retrato do estado fisiopatológico do organismo em resposta a doenças e tratamentos. (Johnson et al., 2016) A metabolômica tem se tornado uma ferramenta útil para detectar biomarcadores metabólicos com objetivo diagnóstico, terapêutico e prognóstico. Metabolômica é o estudo de todos os metabólitos produzidos por uma célula sob um dado conjunto de condições, incluindo suas concentrações e funções. (Donald Voet, Judith G. Voet & Pratt, 2014) Alguns painéis metabolômicos e lipidômicos têm sido identificados em soro e plasma com objetivo de distinguir as variações clínicas na COVID-19 e avaliar sua gravidade. (Zheng et al., 2021). Uma das formas de realizar a análise metabolômica é utilizando a espectroscopia de ressonância nuclear magnética (RNM). A RNM caracteriza as moléculas utilizando o princípio da absorção e da ressonância de radiação de certos átomos quando colocados em campo magnético. Trata-se de técnica não destrutiva e independe de técnicas de separação analítica, com amostras de execução relativamente rápida, fácil e de baixo custo. (Jacob et al., 2019)

#### **1.4 - A COVID-19, inflamação e interleucinas inflamatórias**

Elevação em algumas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias têm sido detectadas em pacientes com COVID-19, dentre elas: IL-1, IL-6, IL-8, IL-17, IL-17, ligante de quimiocina 2, TNF- $\alpha$ , fator estimulador de colônias de granulócitos, proteína 10 induzível por Interferon-Gama (IFN-  $\gamma$ ), proteína-1 quimioatraente de monócitos e proteína inflamatória de macrófagos. A concentração dessas citocinas e quimiocinas varia de acordo com algumas condições do paciente. O aumento da interleucina-6 (IL-6) parece estar diretamente associado a uma piora do estado dos pacientes. (Yazdanpanah et al., 2020) A tempestade de citocinas é uma resposta inflamatória sistêmica descontrolada decorrente da infecção pelo SARS-CoV-2 levando a ativação das respostas imunes naturais e celulares e liberação de grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias. (Ciaccio & Agnello, 2020)

Uma das formas de se analisar as citocinas inflamatórias é utilizando a técnica de citometria de fluxo. Esta técnica quantifica as características ópticas e de fluorescência de células ou partículas individuais em líquido fluindo por um caminho óptico e luz fluorescente. À medida que a partícula passa pelo feixe de luz (geralmente *lasers*), a luz espalhada fornece informações sobre as partículas. Essa luz é captada por um tubo fotomultiplicador, sendo que a dispersão direta fornece informações sobre o tamanho da partícula e a dispersão lateral, sobre a morfologia da partícula. As partículas podem ser analisadas com base em uma fluorescência de fluorocromos usados para a detecção de um alvo (Figura 2). (Vembadi et al., 2019)

**Figura 2** – Princípios da citometria de fluxo



(A) Assim que o feixe de luz atinge a partícula é possível medir diferentes parâmetros (extinção, dispersão e fluorescência) fornecendo informações sobre as propriedades ópticas e de composição da partícula. (B) Esquema mostrando as partículas alinhadas em um fluxo único interagindo com a luz do *laser* posteriormente coletada por detectores (Adaptado de Vembadi, 2019)

### **1.5 - A COVID-19 em idosos (*inflammaging* e imunossenescência)**

Com o avançar da idade, o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias sistêmicas, marcadamente IL-6, e a diminuição dos níveis de citocinas anti-inflamatórias sistemáticas criam uma condição crônica de inflamação conhecida como *inflammaging*. (Franceschi et al., 2000; Fulop et al., 2018; Maggio et al., 2006; Meftahi et al., 2020; Michaud et al., 2013; Sanada et al., 2018)

A vulnerabilidade dos idosos à infecção é explicada pela imunossenescência, que reflete a depressão do sistema imunológico levando-os a maior propensão às infecções. Nesta condição, a produção de células T e B imaturas diminui e a imunidade inata é prejudicada, afetando a progressão para uma resposta imune adaptativa. (Castle, 2000; Fuentes et al., 2017; Kang & Jung, 2020; Meftahi et al., 2020; Ponnappan & Ponnappan, 2011)

Tanto as condições de *inflammaging* e imunossenescência, quanto o estresse oxidativo, super-expressão do receptor da ECA-2, déficit de vitamina D, atividade das células senescentes do tecido adiposo e diminuição da autofagia e da mitofagia, comumente encontrados em idosos, associados à infecção pelo SARS-CoV-2 podem sobrecarregar a amplitude da resposta imune (por exemplo, altos níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$ ), levando a uma crítica tempestade de citocinas. (Meftahi et al., 2020)

Desta forma, identificar moléculas envolvidas na ativação e manutenção da inflamação exacerbada durante a COVID-19 proporcionará informações relevantes para o tratamento e prognóstico dos pacientes.

### **1.6 – Justificativa**

A justificativa do presente estudo foi detectar alterações em amostras dos pacientes infectados com SARS-CoV-2 na fase aguda, avaliando citocinas inflamatórias, transaminases, metabólitos da metabolômica que estivessem associados a diferentes gravidades da COVID-19 e verificar a possibilidade de usá-los como biomarcadores de gravidade da COVID-19.

## **1.7 – Objetivos**

### **1.7.1 – Gerais:**

O objetivo do presente estudo é detectar biomarcadores que estabeleçam relação com a gravidade de pacientes com COVID-19 na admissão hospitalar. Dentre estes biomarcadores estão citocinas inflamatórias, transaminases hepáticas e metabólitos analisados pela metabolômica.

### **1.7.2 – Específicos:**

1) Estabelecer relação entre o perfil imunológico (citocinas inflamatórias) e grupos etários de pacientes com COVID 19;

2) Analisar a relação da diferença entre o perfil imunológico, grupos etários com gravidade e comorbidades;

3) Estabelecer a relação entre níveis de transaminases hepáticas e gravidade da COVID-19;

4) Analisar os níveis de transaminases na COVID-19 e alterações bioquímicas, inflamatórias e imunológicas.

5) Estabelecer a relação do perfil metabolômico (principalmente a fenilalanina) com a gravidade de pacientes com COVID-19;

6) Analisar a relação da fenilalanina e marcadores inflamatórios e perfil imunológico (citocinas inflamatórias).

## **2- Capítulo 2 - Materiais e Métodos**

### **2.1 – Desenho e local de realização do estudo**

Trata-se de um estudo transversal realizado no Hospital Universitário da Universidade Federal de São Carlos (HU-UFSCar).

### **2.2 – Critérios de inclusão / recrutamento**

Os pacientes foram recrutados de junho a dezembro de 2020 e incluídos se apresentassem o diagnóstico de COVID-19 de acordo com as diretrizes da Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2021) e tivessem menos de 14 dias dos sintomas e menos de 11 dias do início da doença até a internação hospitalar ou admissão para observação na emergência do HU-UFSCar.

O diagnóstico da COVID-19 segundo a OMS prevê a coleta de amostras respiratórias para teste de amplificação de ácido nucleico, por exemplo, reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR). Testes repetitivos do trato respiratório superior e/ou trato respiratório inferior podem ser necessários para estabelecer um diagnóstico. (WHO, 2021)

### **2.3 – Critérios de exclusão**

Foram excluídos do trabalho gestantes e pacientes com alíquotas insuficientes de soro para as análises indicadas na pesquisa. Pacientes com mais de 11 dias do início da doença até a internação hospitalar foram excluídos porque esse é o período acima do 75º percentil para o clearance viral.(Cevik et al., 2021) Portanto, buscamos reduzir a chance de interferências secundárias no padrão das citocinas inflamatórias, além da relação entre a infecção do SARS-CoV-2 e a resposta imune.

### **2.4 – Preceitos éticos**

O estudo foi realizado de acordo com as diretrizes estabelecidas na Resolução nº 466/ 2012 do Conselho Nacional de Saúde e todos os procedimentos envolvendo os participantes da pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) (Número: 30184220.8.0000.5504). (Apêndice 1 – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSCar)

Consentimento livre e informado foi obtido por escrito de todos os pacientes ou responsáveis antes de serem incluídos no estudo. (Apêndice 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido)

## **2.5 - Avaliações de estudo**

Todos os pacientes foram avaliados na admissão (internação ou emergência do hospital) com registro dos dados sociodemográficos e clínicos (sinais e sintomas, dados vitais, uso de oxigênio, início dos sintomas), comorbidades crônicas e gravidade da doença no momento da avaliação inicial. As informações foram coletadas utilizando protocolo de extração de dados padronizado (Apêndice 3 – Protocolo de extração de dados), extraídas dos prontuários eletrônicos do Aplicativo de Gestão para Hospitais Universitários do HU-UFSCar.

As comorbidades foram analisadas utilizando o índice de comorbidade de Charlson (ICC), índice desenvolvido por Charlson e colaboradores (Charlson et al., 1987) e composto por 17 condições clínicas (comorbidades), sendo que cada condição recebe uma pontuação com pesos variando entre 0 e 6, estabelecidos baseando-se no risco relativo de morte. A somatória das condições apresentadas pelo paciente, evidencia seu risco de morte. (Charlson et al., 1987; Lucif Junior & Rocha, 2004) (Anexo 1 – Índice de Comorbidade de Charlson)

A gravidade da doença foi avaliada no momento da admissão utilizando três tipos diferentes de avaliação: 1) o *National Early Warning Score 2* (NEWS2); 2) Avaliação da Insuficiência Orgânica Relacionada à Sepse (SOFA) e 3) Classificação de gravidade da doença COVID-19 - OMS, sendo os pacientes em casos leves, moderados e graves (Anexo 2 - Classificação de gravidade da doença COVID-19).

O NEWS2 faz parte do conceito de escores de alerta precoce desenvolvidos em 1997, que se baseia em alterações dos sinais vitais como alerta para o risco de deterioração do estado de saúde do paciente. São ferramentas simples e que podem ser utilizadas a beira leito, alertando para maior ou menor necessidade de atenção ao estado de saúde do paciente. O NEWS2 foi desenvolvido no Reino Unido em 2017, podendo ser utilizado em qualquer momento da atuação intra e extra-hospitalar. O seu escore é calculado



utilizando-se parâmetros fisiológicos (frequência respiratória, saturação de oxigênio, temperatura corporal, pressão arterial sistólica, frequência cardíaca, nível de consciência), uso ou não de oxigenioterapia suplementar e uma avaliação específica para pacientes com insuficiência respiratória hipercápnica, como doença pulmonar obstrutiva crônica. O cálculo final do escore é obtido somando-se os valores atribuídos a cada item, variando de zero (melhor prognóstico) a 23 (pior prognóstico). (Oliveira et al., 2020; Royal College of Physicians, 2020). (Anexo 3 – NEWS2)

O escore de SOFA trata-se de uma pontuação utilizada para descrever uma sequência de complicações em doentes críticos desenvolvido em 1994. (Vincent et al., 1996) O SOFA é utilizado rotineiramente em monitorização de morbidades agudas em unidades de terapia intensiva, além de ser utilizado para o diagnóstico de sepse. Baseia-se em seis escores diferentes para os parâmetros respiratórios, cardiovasculares, hepático, de coagulação, sistema renal e neurológico, com pontuação variando de 0 a 4 para cada sistema, sendo que pontuações maiores refletem piora da disfunção orgânica. (Lambden et al., 2019; Silva & Othero, 2004) (Anexo 4 – SOFA)

A Classificação de gravidade da doença COVID-19 preconizada pela OMS, classifica os pacientes em leve (pacientes sintomáticos que atendem à definição do caso para COVID-19 sem evidência de pneumonia viral ou hipóxia); moderada (adolescente ou adulto com sinais clínicos de pneumonia, isto é, febre, tosse, dispneia e respiração rápida, mas sem sinais de pneumonia grave, incluindo saturação de oxigênio  $\geq 90\%$  em ar ambiente) e grave (adolescente ou adultos com sinais clínicos de pneumonia mais um dos seguintes: taxa respiratória  $> 30$  respirações por minuto, problema respiratório grave -com uso de musculatura acessória e incapacidade de completar frases- ou saturação de oxigênio  $< 90\%$  em ar ambiente).

Nível de fragilidade dos pacientes foi avaliado utilizando a escala clínica de fragilidade (ECF). Essa escala é composta de nove níveis de fragilidade baseadas no estado geral de saúde e habilidade em realizar atividades diárias de vida. Cada aumento do escore representa um aumento significativo no risco de mortalidade e institucionalização do idoso em médio prazo, sendo considerado como sem fragilidade um escore menor ou igual a 3, pré-frágil o

escore de 4 e fragilidade pacientes com escore de 5 ou mais. (Rockwood et al., 2005; Rodrigues et al., 2021) (Anexo 5 – Escala Clínica de Fragilidade)

Todos os pacientes foram tratados para COVID-19 utilizando sempre as últimas recomendações para o manejo da doença, sendo também anotados os outros tratamentos utilizados, como dexametasona, heparina de baixo peso molecular e antibióticos.

## **2.6 - Exames laboratoriais**

Exames bioquímicos habituais foram coletados dentro de 12h da admissão hospitalar e analisados no laboratório do próprio HU-UFSCar. Juntamente com essas amostras, alíquotas de 5 mL de soro foram coletadas e armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}$  C no Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar (LIDI-DMP-UFSCar), onde posteriormente foram descongeladas à temperatura ambiente para análise.

## **2.7 - Marcadores sistêmicos de inflamação / citometria de fluxo**

A análise das citocinas inflamatórias foi realizada no citômetro de fluxo do Laboratório de Biologia do Envelhecimento do Departamento de Gerontologia da UFSCar.

As amostras foram analisadas por citometria de fluxo utilizando BD Accuri C6 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) e citocinas plasmáticas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) foram medidos com kit de inflamação humana de matriz de grânulos citométrica (BD <sup>TM</sup> EBA Human Th1 / Th2 Cytokine Kit, BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). O procedimento foi realizado seguindo as instruções dos fabricantes. Os dados foram analisados usando o software FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, OR, EUA).

As citocinas (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10) foram simultaneamente medidas pelo método de ensaio baseado em células (EBA), nos soros de paciente com COVID-19. O EBA é um método de captura de proteínas, contendo esferas de tamanho e fluorescência conhecidos, podendo assim capturar múltiplas proteínas simultaneamente. Cada esfera está associada a um único anticorpo específico para cada citocina analisada. Assim, as esferas conjugadas a fluorocromos emitem fluorescência. A concentração de cada citocina é obtida

pela intensidade de fluorescência emitida. O Kit Th1/Th2 humano (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) foi utilizado seguindo as instruções do fabricante. Primeiramente foi realizada uma curva padrão das *beads* em oito tubos respectivamente sendo (1:2; 1:4; 1:16; 1:64; 1:128; 1:256) e, em seguida, as amostras dos pacientes foram diluídas 1:4 com diluente G (Kit). Em 50  $\mu$ L da amostra de cada paciente, adicionou-se 50  $\mu$ L do pool citocinas (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10) e 50  $\mu$ L do reagente de detecção Th1/Th2. Cada amostra foi incubada então por três horas em temperatura ambiente e protegida da luz; após o período de incubação, adicionou-se 1mL de tampão de lavagem e centrifugou-se 200g por 5 min, descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 300  $\mu$ L de tampão de lavagem para realizar a leitura.

A leitura foi realizada em citômetro de fluxo Accuri <sup>TM</sup> C6 BD Biosciences, selecionando *gate* R1 com 2100 eventos. A análise foi realizada usando o software FlowJo LLC, Ashland, OR, EUA (BD Biosciences).

## **2.8 – Metabolômica**

### **2.8.1 - Preparação de amostra de soro para medições de RNM**

Após o descongelamento da amostra 500  $\mu$ L de soro sanguíneo foram adicionados ao filtro (Amicon Ultra - 3 kDa) e centrifugados a 14000 g por 30 min a 4 °C. Em seguida, 150  $\mu$ L de soro filtrado foram transferidos para um tubo de RNM de 5 mm (Wilmad Standard Series 5 mm, Sigma-Aldrich) contendo 60  $\mu$ L de tampão de fosfato para aquisição imediata de RNM.

Todos os filtros foram lavados com 500  $\mu$ L de água Milli-Q, seguida de centrifugação a 14.000 g por 5 minutos a 4 °C. Este processo foi repetido cinco vezes. Após a quinta lavagem, girou-se (filtro reverso e rotação a 7500 g por 60 segundos) para eliminar qualquer resíduo de água Milli-Q.

### **2.8.2 - Aquisição de espectro e quantificação de metabólitos**

Todas as medições de RNM foram adquiridas em um espectrômetro Tesla Bruker 14,1 (600 MHz para frequência de hidrogênio), equipado com uma criosonda TXI de 5 mm usando temperatura 343K, TSP-d4 como referência interna, solvente D2O e a cabeça da sonda de detecção inversa, exceto para 13 C (a banda larga direta observar). Nesse momento ocorre o fenômeno de ressonância magnética, situação em que os prótons do hidrogênio das

moléculas sofrem modificações de seu spin decorrente ao campo magnético aplicado, retornando ao seu estado natural após interrompido o estímulo. Essa modificação é identificada e processada digitalmente, dando origem aos espectros de RNM.

Para o espectro  $^1\text{H}$  com sinal de pré-saturação HDO usando onda contínua, os parâmetros foram: tempo de aquisição (AQ = 5,45s), largura de varredura (SWH = 12019 Hz), atraso de relaxamento (d1 = 3s), o tempo de pulso de  $90^\circ$  (p1 = 9,125  $\mu\text{s}$ ) e número de varreduras (ns = 128). Após a aquisição do espectro, as correções de linha de base, a identificação e a quantificação dos metabólitos presentes nas amostras foram conduzidas usando o software Suite 8.6 Chenomx (Chenomx Inc., Edmonton, AB, Canadá) pelo sinal TMSP-d4 (concentração conhecida = 0,5  $\text{mmol.L}^{-1}$ ) como uma referência interna para quantificar outros metabólitos. Todos os espectros foram processados com alargamento de linha de 0,3 Hz (lb) para atenuar o ruído nos sinais espectrais.

## **2.9 - Avaliação das transaminases hepáticas**

Em relação as transaminases hepáticas, definimos como elevação limítrofe os níveis de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) excedendo o limite superior da normalidade (LSN), mas menor que 2x o LSN. Elevações leves a severas foram consideradas quando o aumento foi 2x o LSN. (Kwo et al., 2017)

## **2.10 - Grupos para análise dos dados:**

Os dados foram analisados em três modalidades diferentes:

- 1) Avaliação das interleucinas inflamatórias em relação à idade (sendo o grupo 1, pacientes com menos de 65 anos, chamados de adultos e grupo 2, pacientes com 65 anos ou mais, chamados de idosos) e às interferências das comorbidades e gravidade.
- 2) Avaliação dos dados clínicos e de gravidade obtidos baseados nas transaminases hepáticas (normais, limítrofe e  $>2\text{x LSN}$ )
- 3) Avaliação de dados da metabolômica (entre eles, citocinas inflamatórias e fenilalanina) comparativamente entre pacientes leves, moderados e graves).

## **2.11 - Análise estatística**

De acordo com cada uma das três modalidades de grupos estabelecidos indicados no tópico 2.10, foi estipulado um tipo de análise estatística diferente.

Todas as análises foram conduzidas usando R versão 4.0.3 (The R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria) em R-Studio 1.3.1093 (RStudio Inc., Boston, EUA).

### **2.11.1 – Avaliação das interleucinas inflamatórias em relação à idade (adultos e idosos) e às interferências das comorbidades e gravidade.**

Os dados contínuos foram apresentados como mediana [1<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup> quartil] de acordo com o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Variáveis categóricas foram apresentadas como contagens (porcentagens). As comparações entre os grupos foram feitas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney para variáveis contínuas e teste Qui-quadrado de Pearson com correção de continuidade de Yates para variáveis categóricas. Modelos de regressão linear multivariada foram usados para investigar a relação entre os níveis circulantes de citocinas inflamatórias (variáveis dependentes) e idade. As medidas de citocinas foram transformadas (log10) para que as variáveis atendessem aos pressupostos dos testes estatísticos. Características clínicas e gravidade da doença foram selecionadas para a análise multivariada.

### **2.11.2 - Avaliação dos dados clínicos e de gravidade obtidos em diferentes faixas de transaminases hepáticas (normais, limítrofe e >2x LSN)**

Os dados contínuos foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ou mediana [1<sup>o</sup> - 3<sup>o</sup> quartil] de acordo com o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. As variáveis categóricas foram apresentadas como contagens (porcentagens). As comparações entre os grupos foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste Post Hoc de Bonferroni-Dunn para variáveis contínuas e teste Qui-quadrado de Pearson com correção de continuidade de Yates para variáveis categóricas. A significância estatística foi avaliada em um valor de p bilateral  $< 0,05$ .

### **2.11.3 - Avaliação de dados da metabolômica (entre eles, citocinas inflamatórias e fenilalanina) comparativamente entre pacientes leves, moderados e graves).**

Os dados contínuos foram apresentados como mediana [1º, 3º quartil] de acordo com o teste de Shapiro-Wilk. As variáveis categóricas foram apresentadas como contagens (porcentagens). As comparações entre os grupos foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn, com correção do valor-p de Benjamini-Hochberg, para variáveis contínuas e teste Qui-quadrado de Pearson, com correção de continuidade de Yates, para variáveis categóricas.

Modelos de regressão linear multivariada foram usados para investigar a relação entre os níveis circulantes de fenilalanina e as principais citocinas inflamatórias. As medidas de fenilalanina e citocina foram transformadas ( $\log_{10}$ ) para que as variáveis atendessem aos pressupostos dos testes estatísticos. Características clínicas e gravidade da doença foram selecionadas para a análise multivariada.

## Capítulo 3 - Resultados e Discussões

### 3.1 - Artigo 1: “IL-6 e IL-10 estão associadas com a gravidade da doença e com maior número de comorbidades em idosos com COVID-19”

(Original: *IL-6 and IL-10 are associated with Disease severity and higher comorbidity in adults with COVID-19*). Figura 1.

Publicado em 26 de março de 2021, na revista “*Cytokine*”

[doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155507](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155507)

**Figura 3.1.** Primeira página do artigo “*IL-6 and IL-10 are associated with Disease severity and higher comorbidity in adults with COVID-19*”



### 3.1.1 - Resultados:

Entre julho e outubro de 2020, um total de 167 adultos foram internados no hospital. Vinte e cinco pacientes foram excluídos da análise devido falta de amostra de sangue. A Tabela 3.1 resume as características dos pacientes. Havia 142 indivíduos com idades entre 22 e 99 anos (média de 60 anos). Cerca de metade deles era do sexo masculino (54,2%), com ICC mediano de 2 (variando de um mínimo de 0 a um máximo 8), e um total de 36 pacientes (25,4%) apresentaram alta comorbidade (índice  $\geq 5$ ). A maioria dos pacientes não eram diabéticos (76,8%) nem tinham doenças cardiovasculares (85,2%), nem eram hipertensos (55,6%). Houve uma diferença significativa entre os dois grupos de idade em quase todas as variáveis basais, exceto para sexo ( $p = 1,0$ ), diabetes mellitus ( $p = 0,2$ ), tempo desde o início dos sintomas até a admissão hospitalar ( $p = 0,7$ ), e pontuação NEWS2 na admissão hospitalar ( $p = 0,2$ )



**Tabela 3.1** Características da coorte

Características	Amostra total (n=142)	< 65 anos (n=83)	65+ anos (n=59)	Valor p
Idade, anos	61 [45 – 76]	47 [38,5 – 57,5]	79 [72,5 – 84,5]	< 0,001
Sexo, masculino	77 (54,2)	45 (54,2)	32 (54,2)	1,00
Comorbidades				
Diabetes mellitus	33 (23,2)	16 (19,3)	17 (28,8)	0,2
Doença cardiovascular	21 (14,8)	6 (7,2)	15 (25,4)	0,003
Hipertensão arterial	63 (44,4)	25 (30,1)	38 (64,4)	< 0,001
ICC	2 [0 – 5]	0 [0 – 2]	5 [4 – 6]	< 0,001
ECF				
Geral	3 [2 – 5]	2 [1 – 2,5]	6 [4,5 – 8]	< 0,001
Fragilidade	47 (33,1)	3 (3,6)	44 (74,6)	< 0,001
Tempo do início dos sintomas até a admissão hospitalar, dias	7 [4 – 10]	7 [4 – 10]	6 [4 – 10,5]	0,7
NEWS2 na admissão hospitalar	3 [2 – 5]	3 [2 – 5]	3 [2 – 5]	0,2
SOFA na admissão hospitalar	2 [2 – 3]	2 [2 – 2]	3 [2 – 3]	< 0,001
Internação em UTI	26 (18,3)	14 (16,9)	12 (20,3)	0,01

Os dados contínuos são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ou mediana [1<sup>o</sup> - 3<sup>o</sup> quartil], as variáveis categóricas são apresentadas como contagens (porcentagens) ICC, Índice de Comorbidade de Charlson; ECF, Escala Clínica de Fragilidade; NEWS2, *National Early Warning Score 2*; SOFA, Avaliação da insuficiência orgânica relacionada à sepse; UTI, Unidade de Terapia Intensiva.

A Tabela 3.2 mostra o perfil de citocinas da coorte na admissão hospitalar por grupo de idade. IL-6 e IL-10 foram significativamente maiores entre aqueles com 65 anos e ou mais idade. Por outro lado, nenhuma diferença significativa foi encontrada nos níveis de IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  entre as duas faixas etárias.

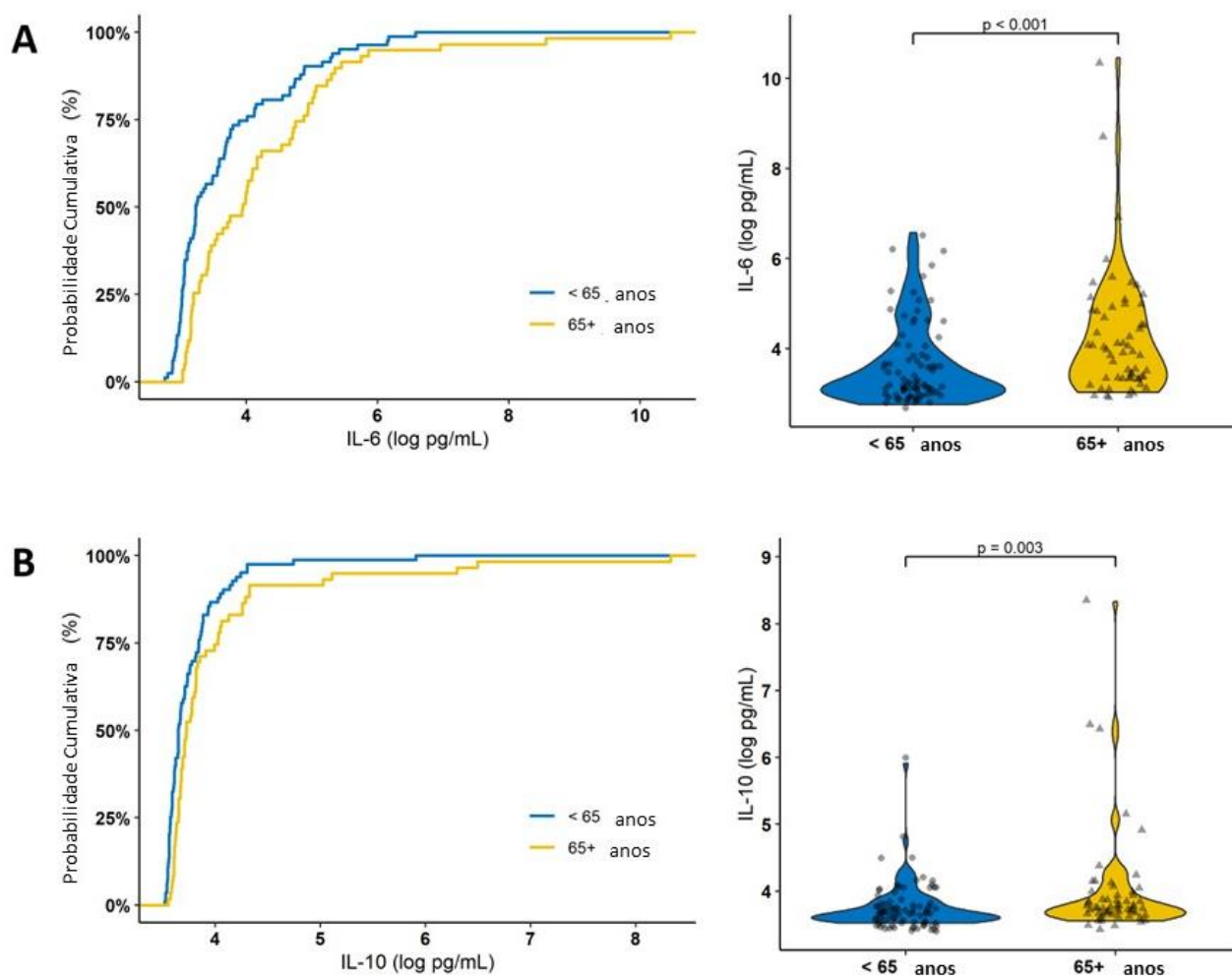
**Tabela 3.2** Nível de citocinas de acordo com os grupos etários

Características	Amostra total (n=142)	< 65 anos (n=83)	65+ anos (n=59)	Valor p
Interleucina-2, pg/mL	14,0 [13,1 – 14,7]	13,8 [12,7 – 14,7]	14,4 [13,6 – 14,7]	0,1
Interleucina-4, pg/mL	19,9 [19,0 – 21,0]	19,9 [18,8 – 20,9]	20 [19,2 – 21,1]	0,4
Interleucina-6, pg/mL	32,6 [22,1 – 93,4]	25,3 [20,5 – 52]	51,6 [25,5 – 123,0]	< 0,001
Interleucina-10, pg/mL	39,7 [36,7 – 47,6]	38,4 [35,8 – 46,6]	41,5 [38,4 – 55]	0,003
Interferon- $\gamma$ , pg/mL	14,9 [13,9 – 17,1]	14,8 [13,6 – 17]	15,1 [14,1 – 17,5]	0,3
Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ , pg/mL	13,2 [12,7 – 14,6]	13,1 [12,6 – 14,2]	13,3 [12,9 – 15]	0,2
Razão IL-6/IL-10	0,8 [0,6 – 1,6]	0,7 [0,6 – 1,1]	0,9 [0,6 – 2,2]	0,004

Os dados contínuos são apresentados como mediana [1º - 3º quartil].

Figura 3.2 mostra a probabilidade cumulativa e os gráficos de distribuição das medidas de IL-6 e IL-10 em cada faixa etária. Nesta figura, podemos observar que cerca de 75% dos indivíduos com menos de 65 anos tinham uma concentração sérica de IL-6 abaixo de 4 log pg/mL, enquanto cerca de 50% daqueles com 65 anos ou mais tinham a mesma concentração. Resultados semelhantes, mas menos pronunciados, foram obtidos com IL-10 e, conseqüentemente, o mesmo foi observado para a relação IL-6/IL-10.

**Figura 3.2.** Probabilidade cumulativa e distribuição em violino de (A) IL-6 (log pg/mL) e (B) IL-10 (log pg/mL) mensuradas de acordo com o grupo etário



Considerando um possível papel da comorbidade e da gravidade da doença nas diferenças observadas relacionadas à idade dos níveis séricos de IL-6 e IL-10, analisamos posteriormente essa relação usando um modelo de regressão linear. A Tabela 3.3 mostra que a idade de 65 ou mais perdeu sua significância após o ajuste para o índice de comorbidade.

**Tabela 3.3** - Modelo de regressão linear para associação das características clínicas e gravidade da doença com os níveis séricos de IL-6 (log pg/mL) e IL-10 (log pg/mL)

Variável dependente: IL-6 (log pg/mL)						
Variáveis independentes	Modelo 1		Modelo 2		Modelo 3	
	Coefficiente $\beta$ padronizado (95% IC)	p	Coefficiente $\beta$ padronizado (95% IC)	p	Coefficiente $\beta$ padronizado (95% IC)	p
Idade						
< 65 anos	Referência	-	Referência	-	Referência	-
65+ anos	0,5 (0,17 – 0,83)	0,003	0,16 (-0,33 – 0,65)	0,5	0,14 (-0,34 – 0,61)	0,5
Sexo, masculino	0,16 (-0,16 – 0,49)	0,3	0,17 (-0,15 – 0,49)	0,2	0,11 (-0,20 – 0,43)	0,4
Índice de Comorbidade de Charlson	-	-	0,09 (-0,01 – 0,19)	0,06	0,08 (-0,02 – 0,19)	0,1
NEWS2 na admissão hospitalar	-	-	-	-	0,12 (0,04 – 0,21)	0,005
SOFA admissão hospitalar	-	-	-	-	0,02 (-0,21 – 0,24)	0,8

Variável dependente: IL-10 (log pg/mL)						
Variáveis independentes	Modelo 4		Modelo 5		Modelo 6	
	Coefficiente $\beta$ padronizado (95% IC)	p	Coefficiente $\beta$ padronizado (95% IC)	p	Coefficiente $\beta$ padronizado (95% IC)	p
Idade						
< 65 anos	Referência	-	Referência	-	Referência	-
65+ anos	0,40 (0,07 – 0,73)	0,02	0,53 (0,03 – 1,02)	0,04	0,51 (0,02 – 1,01)	0,04
Sexo, masculino	0,21 (-0,12 – 0,54)	0,2	0,21 (-0,12 – 0,53)	0,2	0,17 (-0,16 – 0,5)	0,3
Índice de Comorbidade de Charlson	-	-	-0,03 (-0,14 – 0,07)	0,5	-0,04 (-0,15 – 0,07)	0,4
NEWS2 na admissão hospitalar	-	-	-	-	0,09 (0,001 – 0,17)	0,05
SOFA admissão hospitalar	-	-	-	-	-0,001 (-0,23 – 0,23)	0,9

95% IC, 95% Intervalo de confiança

NEWS2, National Early Warning Score 2; SOFA, Avaliação da insuficiência orgânica relacionada à sepse.

O modelo 3 revelou que a pontuação NEWS2 na admissão hospitalar é o único fator independentemente associado a níveis séricos mais elevados de IL-6. Por outro lado, a Tabela 3.3 (modelos 4, 5 e 6) mostra que níveis séricos mais elevados de IL-10 (log pg/mL) permaneceram independentemente associados a ter 65 anos ou mais, após ajuste para índice de comorbidade e gravidade da doença.

Por fim, investigamos mais detalhadamente se havia interação da faixa etária com o Índice de Comorbidade de Charlson, ajustando-o para sexo e gravidade da doença. A Tabela 3.4 mostra que o termo de interação entre idade e ICC é estatisticamente significativo, isto é, o efeito do ICC no aumento dos níveis séricos de IL-6 (log pg/mL) varia com a faixa etária e está independente e positivamente associado a uma idade de 65 anos ou mais ( $p = 0,007$ ).

**Tabela 3.4** - Modelo de regressão linear para associação da interação entre idade e ICC com os níveis séricos de IL-6 (log pg/ml)

<b>Variável dependente: IL-6 (log pg/mL)</b>				
<b>Variáveis independentes</b>	<b>Modelo 7</b>		<b>Modelo 8</b>	
	<b>Coefficiente <math>\beta</math> padronizado (95% IC)</b>	<b>p</b>	<b>Coefficiente <math>\beta</math> padronizado (95% IC)</b>	<b>p</b>
Idade				
< 65 anos: Índice de Comorbidade de Charlson	0,12 (-0,01 – 0,24)	0,06	0,10 (-0,02 – 0,18)	0,1
65+ anos: Índice de Comorbidade de Charlson	0,12 (0,05 – 0,19)	< 0,001	0,11 (0,03 – 0,18)	0,007
Sexo, masculino	0,17 (-0,71 – 0,5)	0,2	0,12 (-0,2 – 0,43)	0,4
NEWS2 na admissão hospitalar	-	-	0,12 (0,04 – 0,21)	0,005
SOFA admissão hospitalar	-	-	0,02 (-0,21 – 0,24)	0,8

95% IC, 95% Intervalo de confiança

NEWS2, National Early Warning Score 2; SOFA, Avaliação da insuficiência orgânica relacionada à sepse

### 3.1.2 - Discussão

Nossos resultados mostram que idosos (com 65 anos ou mais) com COVID-19 têm níveis séricos mais elevados de IL-6 e IL-10 em comparação com menores de 65 anos. Embora a IL-10 esteja independentemente associada à idade e gravidade da doença, os níveis séricos de IL-6 não estão diretamente associados com a idade. O índice de comorbidade parece ser o principal responsável por isso, sendo significativamente associado aos níveis de IL-6 entre aqueles com 65 anos ou mais, além da gravidade da doença.

Semelhante aos nossos resultados, Hashizume (Hashizume, 2020) demonstrou não apenas níveis elevados de IL-6 e IL-10 em alguns pacientes com COVID-19, mas também que essa produção desequilibrada de citocinas prediz a gravidade da doença. Assim, alguns autores demonstraram que os níveis de 66 biomarcadores solúveis em 175 pacientes italianos com diferentes gravidades da COVID-19, Abers e colaboradores (Abers et al., 2021) sugeriram que os níveis aumentados de IL-6 e IL-10 foram independentemente associados à mortalidade. Além disso, uma meta-análise recente incluindo 44 artigos abrangendo 7.865 pacientes mostrou níveis aumentados de IL-6 e IL-10 entre aqueles com doença grave. (Akbari et al., 2020) No entanto, a maioria desses estudos não controlou para fatores intervenientes, como idade, gravidade da doença e comorbidades, destacando a importância dos nossos resultados e apontando para a necessidade de considerar outros aspectos (como gravidade da doença e comorbidade) como fatores de ajuste ao avaliar o risco de idosos com COVID-19.

Durante doenças virais, incluindo COVID-19, a resposta inata induz células infectadas a secretar vários mediadores pró-inflamatórios, gerando uma resposta inflamatória potente. (Copaescu et al., 2020) IL-6 e IL-10 são produzidos localmente no tecido inflamado e liberados na circulação por uma variedade de células diferentes, incluindo macrófagos, linfócitos, fibroblastos e células endoteliais e epiteliais. (Hashizume, 2020) Uma vez produzidas, essas citocinas aumentam o fluxo sanguíneo próximo ao local da infecção e ativam macrófagos e outras células fagocíticas para eliminação do vírus e células infectadas. (Pasrija & Naime, 2021)

IL-6 é um mediador pleiotrópico chave em vários processos inflamatórios, incluindo lesões e infecções nos tecidos. Por outro lado, a IL-10 é conhecida por ter propriedades anti-inflamatórias, iniciando respostas imunes inatas e adaptativas e, portanto, limitando as respostas pró-inflamatórias a fim de prevenir danos aos tecidos. (Hofmann et al., 2012) Portanto, ao longo do curso agudo de uma infecção, a IL-10 inibe a atividade de Células T, células *natural killer* (NK) e macrófagos que, apesar de necessários para eliminação, também são fatores-chave que induzem danos aos tecidos. Portanto, embora limite o dano ao tecido colateral, a IL-10 também pode impedir a eliminação viral bem-sucedida. (Rojas et al., 2017) Assim, o equilíbrio entre os níveis séricos de citocinas IL-6 e IL-10 pode ser uma ferramenta útil para prever a gravidade da doença e mais estudos devem abordar esse recurso para que terapias alternativas possam contribuir com a imunorregulação nestes pacientes. (Lu et al., 2021)

No entanto, compreender as vias que regulam a síntese e produção de IL-6 pode ser a chave para entender como esta citocina participa da gravidade das doenças. Embora neste estudo não foi verificada a participação do TNF- $\alpha$  na produção de IL-6, nós sugerimos que outras vias independentes podem estar envolvidas nesta regulamentação e que a IL-10 pode ter um papel fundamental neste processo. Consequentemente, foi recentemente sugerido que a indução precoce de IL-10 após a infecção por SARS-CoV-2 pode de fato representar um mecanismo de feedback negativo que serve como uma medida contrária à inflamação causada por outros mediadores pró-inflamatórios. (Lu et al., 2021) Como IL-10 endógena aumenta a produção, apesar de ser uma citocina regulatória, pode funcionar como um agente pró-inflamatório, dado que seu *feedback* positivo pode estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias estimulando a tempestade de citocinas. A evidência inicial é limitada e mais estudos são necessários para confirmar o papel da IL-10 em COVID-19.

Nosso estudo reafirmou a importância de considerar a comorbidade no contexto da gravidade da doença relacionada à idade entre aqueles com COVID-19. Essas descobertas não são novas; o papel de várias comorbidades no agravamento do COVID-19 foi demonstrado em vários estudos. (Barek et al., 2020; Biswas et al., 2021; Goodman et al., 2021; Mi et al., 2020) Mesmo assim,

nossos resultados lançam alguma luz nova sobre o conceito, mostrando sua associação independente apenas entre aqueles com 65 anos ou mais.

Uma limitação deste estudo é o seu desenho transversal que não permite a relação temporal entre as variáveis e desfechos estudados. No entanto, o viés devido às variações entre as variáveis independentes e dependentes dentro do mesmo indivíduo foi reduzida. Além disso, o tamanho limitado da amostra e o uso de diferentes medicamentos pré-hospitalares, comuns nesta população, podem representar fatores de confusão relevantes em nosso estudo. Apesar disso, nossos resultados fornecem evidências sobre a relação das citocinas inflamatórias com a idade, destacando a influência das covariáveis sobre ela.

Juntos, nossos resultados reforçam a importância do monitoramento próximo dos níveis de citocinas, com foco especial em IL-6 e IL-10, que pode fornecer informações valiosas sobre a gravidade do COVID-19 e futuras mudanças nas decisões terapêuticas, diminuindo a mortalidade associada nesta faixa etária.

Concluindo, os idosos com COVID-19 apresentam níveis séricos mais elevados de IL-6 e IL-10 em comparação com aqueles com menos de 65 anos. Essa diferença está associada à gravidade da doença e a um índice de comorbidade mais alto entre os maiores de 65 anos. Isso deve aumentar a conscientização sobre a importância do índice de comorbidade, ao invés da idade exclusivamente, durante a estratificação de risco.




### 3.2 - Artigo 2: “Elevação das transaminases hepáticas na COVID-19: (Como) elas estão relacionadas?”

(Original: *Elevations in Liver Transaminases in COVID-19: (How) Are They Related?*). (Pott-Junior et al., 2021) Figura 3.3


Publicado em 15 de julho de 2021, na revista “*Frontiers in Medicine (Gastroenterology)*”

doi: 10.3389/fmed.2021.705247

**Figura 3.3.** Primeira página do artigo “: *Elevations in Liver Transaminases in COVID-19: (How) Are They Related?*”



ORIGINAL RESEARCH  
published: 15 July 2021  
doi: 10.3389/fmed.2021.705247



## Elevations in Liver Transaminases in COVID-19: (How) Are They Related?

Henrique Pott-Junior<sup>1\*</sup>, Natália Queiroz Prado Bittencourt<sup>1</sup>, Silvana F. G. Chacha<sup>1</sup>, Rafael Luis Luporini<sup>1,2</sup>, Marcia Regina Cominetti<sup>2</sup> and Fernanda de Freitas Anibal<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> Department of Medicine, Federal University of São Carlos, São Carlos, Brazil, <sup>2</sup> Biotechnology Graduate Program, Federal University of São Carlos, São Carlos, Brazil, <sup>3</sup> Department of Gerontology, Federal University of São Carlos, São Carlos, Brazil, <sup>4</sup> Department of Biological Sciences Parasitology, Federal University of São Carlos, São Carlos, Brazil

Liver involvement in COVID-19 is not yet well-understood, but elevations in liver transaminases have been described to occur in 14–53% of the cases and are more frequently seen in severe disease. This cross-sectional study explored the relationship between the elevations in liver transaminases and inflammatory parameters in 209 adults with COVID-19. Demographic and clinical data, serum levels of inflammatory cytokines and liver aminotransferases were analyzed. Three groups were formed according to the liver transaminase abnormalities: (I) Normal transaminases, (II) Borderline transaminases elevation, and (III) Mild to severe transaminases elevation. Altered liver transaminases were directly related to disease severity, showing association with the NEWS2 score at admission and greater need for ICU or death. Moreover, higher levels of IL-2 and CRP were associated with borderline transaminases elevations, whereas higher levels of IL-10 and Neutrophil to Lymphocyte ratio were associated with mild to severe transaminases elevation. These results reinforce the importance of liver transaminases in patients with COVID-19 as a complementary marker for disease severity and also point to them as a parameter reflecting the continuous dynamics between viral infection and the immune response.

**Keywords:** inflammation, interleukin-2, interleukin-10, lymphocytes, SARS-CoV-2, hepatitis, transaminases

**OPEN ACCESS**

**Edited by:**  
Xingshun Qi,  
General Hospital of Shenyang Military  
Command, China

**Reviewed by:**  
Nurshad Ali,  
Shaheedul University of Science and  
Technology, Bangladesh  
Yanyan Wu,  
General Hospital of Northern Theater  
Command, China

**\*Correspondence:**  
Henrique Pott-Junior  
henriquepott@ufscar.br

**Specialty section:**  
This article was submitted to  
Gastroenterology,  
a section of the journal  
Frontiers in Medicine

**Received:** 06 May 2021  
**Accepted:** 18 June 2021  
**Published:** 15 July 2021

**Citation:**  
Pott-Junior H, Bittencourt NPQ,  
Chacha SFG, Luporini RL,  
Cominetti MR and Anibal FdF (2021)  
Elevations in Liver Transaminases in  
COVID-19: (How) Are They Related?  
Front. Med. 8:705247.  
doi: 10.3389/fmed.2021.705247

## INTRODUCTION

More than a year has passed since the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) was first described, and several characteristics of the coronavirus disease (COVID-19) remain to be better explained. With more than 100 million reported cases of infection the COVID-19 reached pandemic status in March 2020, and up to date, no specific antiviral treatment has been proven to be effective against this disease, imposing an extensive burden on health care worldwide (1, 2).

During COVID-19, patients can be asymptomatic or present a wide range of clinical symptoms (3). Gastrointestinal symptoms have been described to occur up to 15% (4), and were attributed to viral cell invasion mediated by Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) receptors at the enterocyte level (5). Although not fully understood, the involvement of the liver with elevated levels of hepatic enzymes in blood biochemistry tests has also been described to occur in 14–53% of the cases (6–10). Possible mechanisms that may be associated with liver damage during COVID-19 are (1) an immune-mediated inflammation; (2) a direct cytotoxic effect caused by viral replication of hepatocytes; (3) a drug-induced liver injury, including self-prescribing medications and those used for the treatment of COVID-19, such as remdesivir, tocilizumab, chloroquine; and (4) reactivation of previously existing liver diseases (11, 12).

Frontiers in Medicine | www.frontiersin.org 1 July 2021 | Volume 8 | Article 705247

### **3.2.1 - Resultados:**

Um total de 209 pacientes admitidos consecutivamente no hospital foram incluídos neste estudo. A Tabela 3.5 descreve as características basais da coorte. A maioria dos sujeitos era do sexo masculino (56%) e tinha média de idade de  $59,4 \pm 18,4$  anos, variando de 21 a 99 anos. A mediana do índice de comorbidade de Charlson foi 2 [1<sup>o</sup> – 3<sup>o</sup> quartil, 0 4], e cerca de um quinto (20%) dos indivíduos apresentava alto índice de comorbidade ( $\geq 5$ ). A maioria dos pacientes não era diabética (76%) nem tinha doenças cardiovasculares (73%), nem era hipertensa (52%).

**Tabela 3.5** Características da coorte

<b>Características</b>	<b>Amostra total (N=209)</b>
Idade, anos	59 [44, 74]
Sexo feminino	92 (44)
ICC	2 [0, 4]
Alta comorbidade (ICC ≥ 5)	42 (20,1)
Comorbidades	
Hipertensão arterial	100 (47,8)
Doenças cardiovasculares	35 (16,7)
Diabetes	50 (23,9)
NEWS2 na admissão	4 [3, 6]
Gravidade da doença	
Leve	22 (10,5)
Moderado	87 (41,6)
Grave	100 (47,8)
Tempo do início dos sintomas até a internação hospitalar, dias	7 [5, 10]
Sintomas gastrointestinais	
Diarreia	40 (19,1)
Vômito	20 (9,6)
Dor abdominal	16 (7,7)
Necessidade de internação na UTI durante a internação	81 (38,8)
AST (U/L)	35 [24-56]
ALT (U/L)	28 [18-54]
Fosfatase alcalina (U/L)	66 [50-84]
Gama-Glutamil Transferase (U/L)	54 [33-121]
Billirubina total (mg/dL)	0,5 [0,4-0,6]
Albumina (g/L)	
Contagem de linfócitos (x10 <sup>9</sup> /L)	1,038 [0,67-1,501]
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)	224 [179-275]
D-dímero (µg/mL)	880 [420-1850]
Lactato desidrogenase (U/L)	298 [219-448]
Medicamentos prescritos	
Heparina de baixo peso molecular	
Dose profilática	74 (35,4)
Dose intermediária	43 (20,6)
Dose terapêutica	36 (17,2)
Glicocorticoides	136 (65,1)
Antibióticos	131 (62,7)

Os dados contínuos são apresentados como mediana [1º, 3º quartil], Variáveis

categóricas são apresentadas como contagens (percentuais).

ICC, Índice de comorbidade de Charlson; NEWS2; *National Early Warning Score 2*; UTI,

Unidade de Terapia Intensiva; AST, Aspartato Aminotransferase ; ALT, Alanina

Aminotransferase;

A Tabela 3.6 mostra os padrões dos testes de transaminase hepática. Cento e dezesseis (55,5%) participantes apresentavam testes de transaminase hepática normais na admissão hospitalar, enquanto 55 (26,3%) apresentavam elevações limítrofes e 38 (18,2%) apresentavam elevações maiores que o dobro do LSN. Os grupos eram bastante semelhantes exceto pelo escore NEWS2, gravidade da doença na admissão hospitalar, necessidade de admissão em unidade de terapia intensiva (UTI) durante a hospitalização, níveis séricos de IL-2, IL-10 e proteína C reativa e proporção de neutrófilos/linfócitos. As comparações de pares revelaram diferenças significativas entre aqueles com testes de bioquímica hepática normais, em comparação com aqueles com elevações superiores a duas vezes o LSN para pontuação NEWS2, gravidade da doença na admissão hospitalar, níveis séricos de IL-10 e proteína C reativa (PCR) e proporção de neutrófilos/linfócitos. Os resultados para elevações limítrofes foram bastante semelhantes àqueles com testes de transaminase hepática normais, exceto pelo escore NEWS2, gravidade da doença na admissão hospitalar, níveis séricos de IL-2 e PCR. Esses resultados podem ser vistos na Figura 3.4, como um processo contínuo progredindo para uma maior gravidade de doença e inflamação.

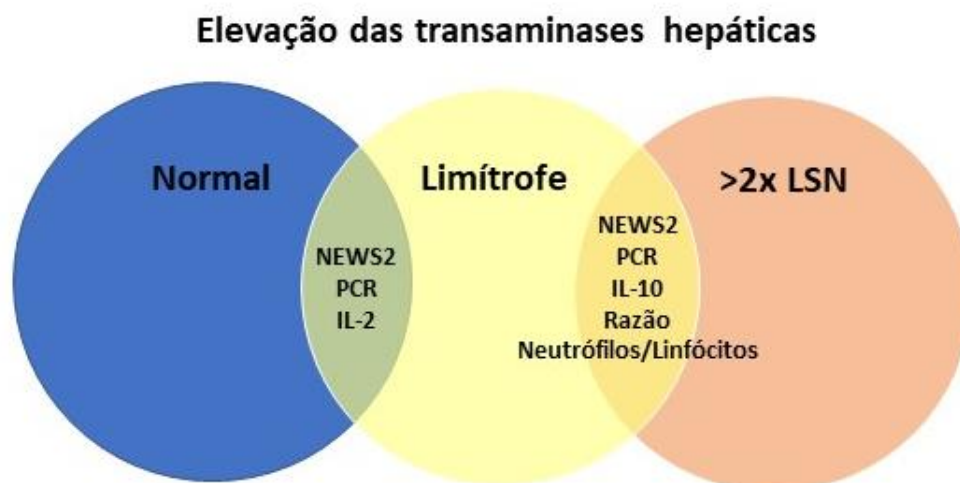
**Tabela 3.6** Características das elevações das transaminases hepáticas

Característica	Normal (n=116)	Limítrofe (n=55)	>2x LSN (n=38)	p
Idade, anos	60,5 [44-76,5]	57 [44-68]	55,5 [45-71]	0,6
Sexo feminino	55 (47,4)	23 (42,8)	14 (36,8)	0,4
ICC	2 [0-4]	2 [0-4]	2 [0-3]	0,6
NEWS2 da admissão	3 [2-5]	5 [3-7]	5 [4-7]	0,001 <sup>ab</sup>
Gravidade da doença				0,003
Leve	18 (15,5)	4 (7,5)	0 (0)	
Moderado	54 (46,6)	20 (36,4)	13 (34,2)	
Grave	44 (37,9)	31 (56,4)	25 (65,8)	
Tempo do início dos sintomas até a internação hospitalar, dias	7 [4-10]	7 [5-10,5]	7 [5-8]	0,3
Tempo de internação hospitalar, dias	7 [1-14]	8 [4-17]	9 [5-19]	0,07
Necessidade de internação na UTI durante a internação	36 (31)	24 (43,6)	21 (55,3)	0,01
Mortalidade de 30 dias	8 (6,9)	9 (16,4)	6 (15,8)	0,08
Internação na UTI ou morte	39 (33,6)	27 (49,1)	23 (60,5)	0,007
Marcadores inflamatórios				
Interleucina-2, pg/mL	13,8 [12,7-14,9]	14,5 [13,6-15,4]	14,2 [13,5-14,9]	0,01 <sup>b</sup>
Interleucina -4, pg/mL	19,8 [19-20,8]	20,1 [19,6-20,9]	20 [19,2-21,8]	0,3
Interleucina -6, pg/mL	35,3 [21,5-99,8]	42,9 [27-111,7]	41,7 [30,4-114,8]	0,06
Interleucina -10, pg/mL	39,7 [36,7-46,9]	41,9 [37,6-49,8]	44,9 [39,2-55,9]	0,03 <sup>a</sup>
Fator de Necrose tumoral $\alpha$ , pg/mL	13,3 [12,6-14,7]	13,3 [12,9-14,6]	13,3 [12,8-14,6]	0,6
Interferon- $\gamma$ , pg/mL	14,9 [13,9-17,1]	15,1 [14,1-17,8]	16,1 [13,6-18,6]	0,5
Relação IL-6 / IL-10	0,9 [0,6-1,6]	1,0 [0,7-2,1]	0,9 [0,7-1,8]	0,1
Proteína C-reativa, mg/dL	6,7 [0,9-13,5]	11,8 [4,8-21,1]	23,6 [7,7-17,2]	<0,001 <sup>ab</sup>
Razão N/L	4,7 [2,8-8,4]	6,3 [3,6-10]	6,7 [4,4-10,6]	0,02 <sup>a</sup>

Os dados contínuos são apresentados como mediana [1<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup> quartil], Variáveis categóricas são apresentadas como contagens (percentuais), Comparações de pares *post hoc* ( $p < 0,05$ ): <sup>a</sup> Normal vs > Elevação de 2 vezes, <sup>b</sup> Normal vs Limítrofe.

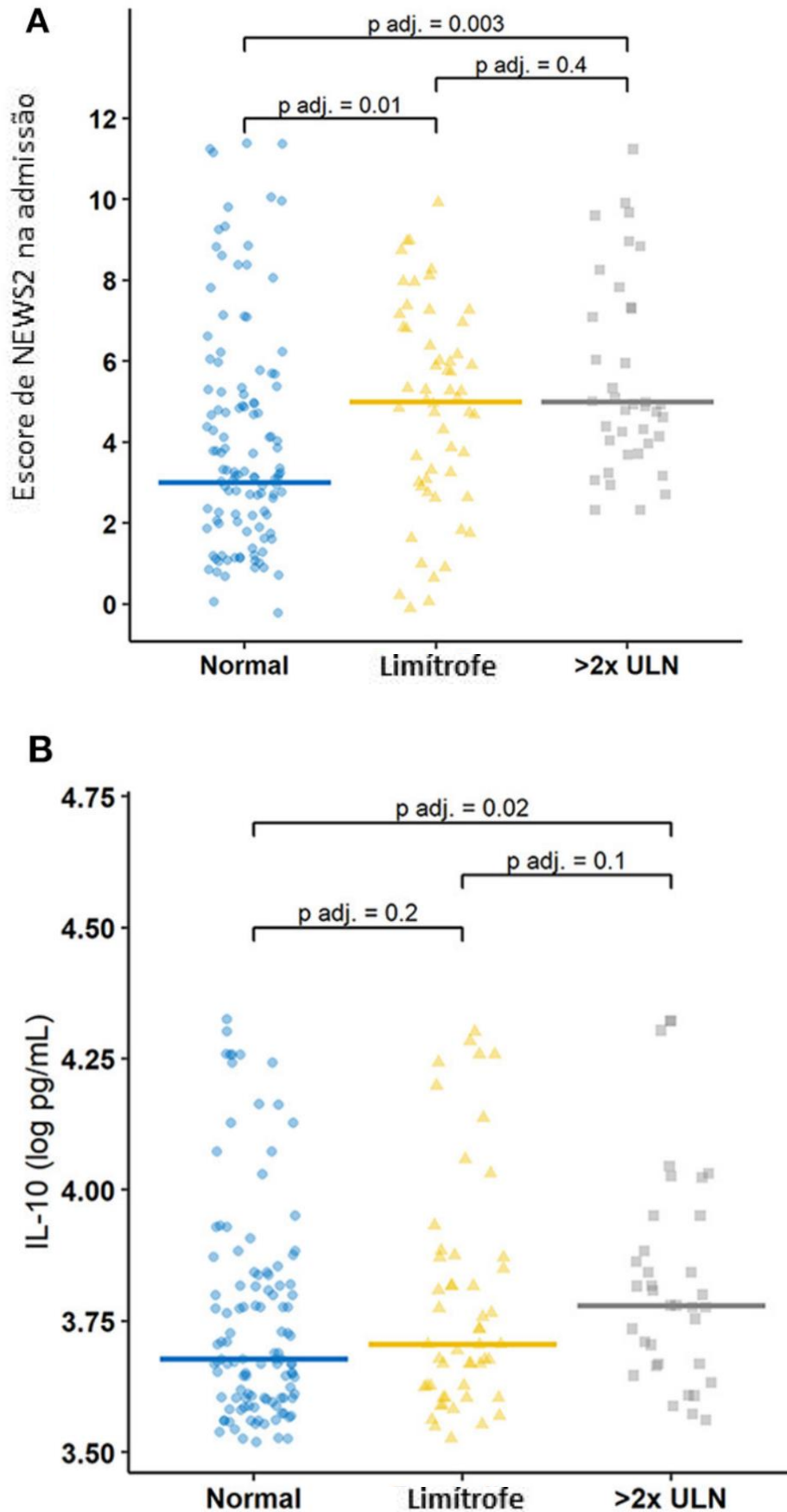
ICC, Índice de comorbidade de Charlson; NEWS2, *National Early Warning Score 2*; Razão N/L, neutrófilo para razão linfócito

**Figura 3.4** – Relação entre a elevação das transaminases hepáticas e marcadores inflamatórios em pacientes adultos com COVID-19



A Figura 3.5A mostra a distribuição da pontuação NEWS2 na admissão hospitalar em cada grupo. Os pacientes com elevações normais da transaminase hepática tiveram pontuações NEWS2 significativamente mais baixas na admissão hospitalar em comparação com os outros dois grupos. A Figura 3.5B mostra que os participantes com elevações da transaminase hepática > 2x LSN tiveram níveis séricos significativamente mais elevados de IL-10 (log pg/mL) em comparação com aqueles com níveis normais de transaminase hepática.

**Figura 3.5** – Gráfico de distribuição de Jitter de (A) Escore de NEWS2 na admissão hospitalar e (B) IL-10 (log pg/mL) medidos de acordo com o grupo de transaminases



### 3.2.2 - Discussão

Desde a publicação da primeira série de casos de COVID-19, o envolvimento hepático tem sido demonstrado por meio da elevação das enzimas hepáticas, que pode ocorrer por meio de um alvo direto do SARS-CoV-2 ou secundário às alterações sistemáticas causadas pela infecção viral. (Wang et al., 2020) Neste estudo, mostramos que a gravidade da doença e os marcadores inflamatórios estão associados a elevações progressivas nos níveis de transaminases hepáticas em pacientes adultos com COVID-19. Além disso, os níveis plasmáticos de IL-2 foram associados a elevações que excedem o LSN, mas menor que duas vezes o LSN, enquanto a proporção de neutrófilos/linfócitos e IL-10 foram associados a um aumento de, pelo menos, duas vezes o LSN.

Embora existam vários mecanismos pelos quais SARS-CoV-2 leva a danos no fígado, quatro foram considerados com maior frequência: (1) efeito citopático direto, (2) efeito secundário à inflamação sistêmica, (3) exacerbação de doença hepática preexistente e (4) toxicidade induzida por drogas usadas no tratamento da COVID-19. Em primeiro lugar, um efeito citopático direto do vírus, embora improvável, deve ser considerado, dada a presença de receptores ECA2 nos hepatócitos. (Alqahtani & Schattenberg, 2020) No entanto, o segundo mecanismo parece ser mais provável de ocorrer. É um dano colateral de uma resposta imune desregulada em casos graves em que há uma liberação maciça de citocinas inflamatórias que acabam causando danos ao fígado. (Ali & Hossain, 2020; Y. Li & Xiao, 2020; Tian & Ye, 2020) Foram relatados casos de descompensação hepática aguda pelo COVID-19 em pacientes com doença hepática preexistente, particularmente em cirrose e doença hepática relacionada ao álcool. (Gao et al., 2021; Marjot et al., 2021; Pan et al., 2021) Em nosso estudo não foi possível avaliar se os pacientes apresentavam doenças hepáticas subclínicas pré-existentes (como por exemplo esteatose hepática) que poderiam levar a viés nos resultados. A toxicidade induzida por drogas usadas no tratamento da COVID-19 também foi considerada. (Zhong et al., 2020) Inúmeros medicamentos têm sido usados em todo o mundo para tratar pacientes com COVID-19 e a hepatotoxicidade já foi comprovada como um potencial efeito colateral de vários desses medicamentos. (Ali, 2020; Almas et al., 2021; Alqahtani & Schattenberg, 2020; Nardo et al., 2021)



Aqui, formulamos a hipótese de que os danos ao fígado refletem a dinâmica contínua entre a infecção viral e a resposta imune. Primeiramente, demonstramos que as elevações das transaminases hepáticas estavam diretamente relacionadas à gravidade da doença, mostrando sua associação com o escore NEWS2 na admissão e a maior necessidade de UTI ou óbito, o que corrobora com estudos anteriores que correlacionaram a elevação das transaminases hepáticas com a gravidade da doença. (Ali, 2020; Ali & Hossain, 2020; C. Huang et al., 2020; Jothimani et al., 2020; Magro et al., 2020; Saini et al., 2020; Tian & Ye, 2020; Zhong et al., 2020) Especificamente Saini et al. (Saini et al., 2020) demonstraram que 21% dos pacientes com COVID-19 e enzimas hepáticas normais necessitaram de UTI, em comparação com 37 e 52% entre aqueles com enzimas hepáticas aumentadas e lesão hepática, respectivamente.

Em seguida, mostramos que níveis mais elevados de IL-2 e PCR estavam associados a elevações que excediam a faixa de LSN, mas menos do que o dobro do LSN. IL-2 desempenha um papel central na modulação e expressão de receptores celulares de várias outras citocinas e fatores de transcrição, promovendo ou inibindo cascatas de citocinas que se correlacionam com a proliferação de células T CD4 + e CD8 + e com a atividade de células natural killers. (Gaffen & Liu, 2004; Liao et al., 2011) Em pacientes com COVID-19 hospitalizados devido a hipoxemia, IL-2 aparece em níveis mais elevados, embora os estudos não tenham demonstrado uma correlação direta com um pior resultado no quadro do paciente. (De Biasi et al., 2020; Han et al., 2020; Liu et al., 2020)

Digno de nota, uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos de PCR e as enzimas hepáticas elevadas foi descrita por outros. (Ali, 2020; Saini et al., 2020) Em consonância com essa suposição, nosso estudo evidenciou que a proporção de neutrófilos / linfócitos e IL-10 estão associados a um aumento de pelo menos duas vezes o LSN nas transaminases hepáticas, o que pode sugerir o efeito da hiperinflamação levando a lesão hepática. (Zhong et al., 2020) Além disso, uma linfopenia persistente foi descrita como um marcador de gravidade da doença no COVID-19 desde a descrição da primeira série de casos. Qin e colaboradores (Qin et al., 2020) demonstraram a presença de linfopenia, maiores biomarcadores relacionados à infecção (procalcitonina, taxa de

hemossedimentação, ferritina sérica e PCR) e elevação de várias citocinas inflamatórias (IL-2R, IL-6, IL-8, IL-10, e TNF- $\alpha$ ) nos casos graves de COVID-19 em comparação com os não graves. No entanto, a resposta imune não é um evento isolado, mas sim uma série contínua de eventos. Foi demonstrado que uma queda progressiva na contagem de linfócitos leva à elevação progressiva dos níveis de IL-10, que atua como um regulador de citocinas inflamatórias e um potencializador da proliferação de células B. (Lu et al., 2021; Naing et al., 2016; Tilg et al., 2002) Assim, estudos têm relacionado níveis mais elevados de IL-10 em pacientes com COVID-19 ao aumento da produção de outras citocinas inflamatórias sistêmicas, que podem contribuir para a gravidade da doença. (Lu et al., 2021; Luporini et al., 2021) Assim, IL-10 parece ser uma citocina chave no processo inflamatório relacionado ao COVID-19 e correlacionar os níveis de IL-10 com outros parâmetros inflamatórios pode contribuir para o entendimento de como essa tempestade de citocinas pode levar a danos em outros órgãos, como o fígado.

Este trabalho tem algumas limitações que incluem sua natureza transversal e unicêntrica que evita inferências de resultados causais preditivos. Ademais, os níveis dos parâmetros enzimáticos e inflamatórios hepáticos foram registrados uma vez no momento da admissão, ao passo que medições consecutivas teriam dado uma ideia melhor da dinâmica entre a resposta imune e as elevações das transaminases hepáticas. Decorrente a baixa prevalência de consumo de álcool, hepatite viral crônica, cirrose e presença de esteatose hepática não foram avaliadas na população do estudo. A baixa prevalência de cada comorbidade avaliada neste estudo impossibilitou a análise de seu impacto individual no perfil inflamatório e na gravidade da doença.

Ainda assim, em conjunto, nossos resultados reforçam a importância de analisar os níveis de transaminases hepáticas em pacientes com COVID-19 como um marcador complementar de gravidade da doença. Além disso, também pode refletir a dinâmica contínua entre a infecção viral e a resposta imune e a escolha terapêutica em condições em que há associações de medicamentos. Em resumo, as transaminases hepáticas são marcadores complementares da gravidade da doença em pacientes com COVID-19. IL-2 surge como um marcador potencial para elevações de transaminase limítrofes, enquanto IL-10

está principalmente associada a elevações de transaminase moderadas a graves. Essas associações refletem a interação dinâmica contínua entre a infecção viral e a resposta imune, e suas consequências.

### 3.3 - Artigo 3: “Fenilalanina e COVID-19: rastreando marcadores de gravidade” (Original: *Phenylalanine and COVID-19: Tracking Disease severity markers*).

Publicado em 01 de novembro de 2021, na revista “*International Immunopharmacology*” (Luporini, Pott-Junior, et al., 2021) Figura 3.6

doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108313

**Figura 3.6.** Primeira página do artigo “*Phenylalanine and COVID-19: Tracking Disease severity markers*”

International Immunopharmacology 101 (2021) 108313

Contents lists available at ScienceDirect

**International Immunopharmacology**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/intimp](http://www.elsevier.com/locate/intimp)






## Phenylalanine and COVID-19: Tracking disease severity markers

Rafael Luís Luporini<sup>a,b</sup>, Henrique Pott-Junior<sup>a,\*</sup>, Maria Carolina B. Di Medeiros Leal<sup>c</sup>,  
Alex Castro<sup>c</sup>, Antonio Gilberto Ferreira<sup>c</sup>, Marcia Regina Cominetti<sup>d</sup>,  
Fernanda de Freitas Anibal<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> Department of Medicine, Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos, Brazil  
<sup>b</sup> Biotechnology Graduate Program, Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos, Brazil  
<sup>c</sup> Department of Biological Sciences Parasitology, Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos, Brazil  
<sup>d</sup> Department of Gerontology, Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos, Brazil  
<sup>e</sup> Department of Chemistry, Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos, Brazil

---

**ARTICLE INFO**

**Keywords:**  
 COVID-19  
 SARS-CoV-2  
 Cytokines  
 Phenylalanine  
 Tyrosine

**ABSTRACT**

**Background:** Although there are several severity predictors for COVID-19, none are specific. Serum levels of phenylalanine were recently associated with increased inflammation, higher SOFA scores, ICU admission, and mortality rates among non-COVID-19 patients. Here, we investigated the relationship between phenylalanine and inflammatory markers in adults with COVID-19.

**Methods:** We assessed adults with COVID-19 at hospital admission for clinical and laboratory data. Nuclear magnetic resonance spectroscopy measured serum levels of phenylalanine and other amino acids of its metabolic pathway. Flow Cytometry measured serum levels of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ . Linear regression models adjusted for potential confounders assessed the relationship between serum levels of phenylalanine and inflammatory cytokines.

**Results:** Phenylalanine and tyrosine were significantly lower in mild disease as compared to moderate and severe groups. Linear regression models showed that phenylalanine is independently and positively associated with disease severity regardless of the cytokine analyzed and after adjustment for potential confounders. In addition, mild cases showed consistently lower serum phenylalanine levels within the first ten days from disease onset to hospital admission.

**Conclusion:** Phenylalanine is a marker of disease severity. This association is independent of the time between the onset of symptoms and the magnitude of the inflammatory state.

---

**1. Background**

COVID-19 exhibits a spectrum of manifestations ranging from asymptomatic or mild flu-like symptoms to severe pneumonia with acute respiratory distress syndrome and death [1]. The degrees of increasing severity reflect different clinical and laboratory findings, response to therapy, and clinical evolution [2]. In this regard, the literature points out that about 50 markers (including demographic, patient history, physical examination, laboratory, radiological data, and a high Sequential Organ Failure Assessment (SOFA score) can provide valuable prognostic information about mortality disease severity [3]. However, most of these markers are not specific and share similarities with other conditions. Moreover, they do not explain why some patients

progress to severe states or the determinants of the speed at which it occurs. Thus, there is a need to investigate alternative predictors of disease severity and death.

Approximately 20% of COVID-19 patients develop a severe inflammatory-mediated hypoxemic disease that resembles a cytokine-storm syndrome characterized by high levels of pro-inflammatory cytokines such as interleukin 1 (IL-1), IL-6, and TNF- $\alpha$  [4]. Accordingly, we and others have shown that serum IL-6 and IL-10 levels are significantly associated with disease severity and progression [5–8]. Recently, a few studies have shown the incidence of clinically significant metabolic changes that may interfere with disease severity and prognosis [9–11].

Metabolomic studies can provide a portrait of the physiological state of an organism responding to pathogenic challenges and treatment [12].

---

\* Corresponding author at: Department of Medicine, Federal University of São Carlos, Rod. Washington Luis, km 235, São Carlos, SP 13565-905, Brazil. Tel.: +55 16 33066663.  
 E-mail address: [henriquepott@ufscar.br](mailto:henriquepott@ufscar.br) (H. Pott-Junior).

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108313>  
 Received 10 August 2021; Received in revised form 15 October 2021; Accepted 24 October 2021  
 Available online 1 November 2021  
 1567-5769/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

### **3.3.1 - Resultados:**

#### **3.3.1.1 - Características base dos participantes do estudo**

Foram incluídos um total de 166 indivíduos. A mediana geral de idade foi de 60 anos, variando de 22 a 99 anos. Cerca da metade era do sexo masculino (53,6%), com mediana do ICC de 2, e cerca de um quarto (24,7%) deles apresentava alta comorbidade (ICC  $\geq$  5). Quase metade era hipertensa (47%), enquanto a maioria não era diabética (69,9%), nem tinha doenças cardiovasculares (84,9%). Tabela 3.7 resume as características demográficas e clínicas da linha de base para cada grupo de gravidade. Os pacientes com doença leve eram significativamente diferentes daqueles com condições moderadas e graves em relação ao sexo, idade, ICC e pontuação NEWS2 na admissão. Além das diferenças esperadas na pontuação do NEWS2 na admissão, não houve diferenças significativas entre os grupos moderado e grave.

**Tabela 3.7** Características dos sujeitos envolvidos

Variável	Geral (N=166)	Leve (n=21)	Moderado (n=84)	Grave (n=61)	p
Sexo masculino	89 (53,6)	5 (23,8)	46 (54,8)	38 (62,3)	0,009 <sup>ab</sup>
Idade, anos	60 [44-74]	38 [35-49]	61 [47-73]	65 [48-79]	< 0,01 <sup>ab</sup>
Mais de 65 anos	65 (39,2)	3 (14,3)	31 (36,9)	31 (50,8)	0,01 <sup>b</sup>
Comorbidades					
Hipertensão	78 (47)	6 (28,6)	43 (51,2)	29 (47,5)	0,1
Diabetes mellitus	50 (30,1)	3 (14,3)	29 (34,5)	18 (29,5)	0,1
Doenças cardiovasculares	25 (15,1)	2 (9,5)	12 (14,3)	11 (18)	0,6
Índice de Comorbidade Charlson	2 [0-4]	0 [0-0]	2 [0-4]	3 [1-5]	0,001 <sup>ab</sup>
Tempo do início dos sintomas até a internação hospitalar - dias	7 [4-10]	7 [6-10]	7 [4-10]	7 [4-10]	0,8
NEWS2 na internação hospitalar	4 [2-5]	1 [1-1]	3 [2-4]	5 [5-6]	<0,001 <sup>abc</sup>

Os dados contínuos são apresentados como mediana [<sup>1º</sup>, <sup>3º</sup> quartil]. Variáveis categóricas são apresentadas como contagens (percentuais). Comparações emparelhadas *post hoc* ( $p < 0,05$ ) em pares: <sup>a</sup> Leve vs Moderado, <sup>b</sup> Leve vs Grave, <sup>c</sup> Moderado vs Grave.

NEWS2; *National Early Warning Score 2*.

### **3.3.1.2 - Fenilalanina e outros parâmetros laboratoriais de acordo com a gravidade da doença**

Os níveis séricos basais de fenilalanina e outros parâmetros laboratoriais foram avaliados na admissão hospitalar e estratificados de acordo com a gravidade da doença (ver Tabela 3.8). Os testes *post hoc* indicaram que todos os grupos eram significativamente diferentes uns dos outros, exceto para os níveis séricos de IL-4, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , histidina, ornitina e creatinofosfoquinase. A fenilalanina foi significativamente menor na doença leve em comparação com os grupos moderado e grave (ambos com  $p$  ajustado  $<0,001$ ). A tirosina também foi menor na doença leve (ambos com  $p$  ajustado = 0,03). Além disso, os indivíduos com doença grave apresentaram menor taxa mediana de filtração glomerular estimada quando comparados aos grupos leve e moderado ( $p$  ajustado = 0,05 e 0,04, respectivamente).

**Tabela 3.8** Fenilalanina e outros parâmetros laboratoriais na admissão hospitalar, de acordo com o grupo de gravidade

Variável	Geral (N=166)	Leve (n=21)	Moderado (n=84)	Grave (n=61)	p
Contagem de linfócitos ( $\times 10^9/L$ )	1,16 [0,72-1,58]	2,17[1,55-2,65]	1,17 [0,35-1,52]	0,8 [0,52-1,42]	< 0, ,001 <sup>abc</sup>
Lactato desidrogenase (U/L)	276 [215-387]	185 [167-265]	247 [205-350]	336 [270-486]	< 0,001 <sup>abc</sup>
Proteína C-reativa (mg/dL)	6,5 [1,1-13,6]	0,6 [0,1-0,6]	5,1 [1,1-11,6]	11,6 [5-18,5]	< 0,001 <sup>abc</sup>
IL-2 (pg/dL)	14,1 [12,9-14,7]	12,2 [11,5-13,6]	14,1 [13,2-14,8]	14,4 [13,6-14,9]	< 0,001 <sup>ab</sup>
IL-4 (pg/dL)	20 [19,1-21]	19,4 [18,6-20,5]	19,9 [18,8-21]	20,3 [19,4-21,1]	0,1
IL-6 (pg/dL)	35,3 [15,8-94,1]	20,1 [18,8-22,1]	34,4 [23,5-70,6]	59,7 [31,9-140,4]	< 0,001 <sup>abc</sup>
IL-10 (pg/dL)	40,4 [36,9-48,5]	36,1 [34,8-37,6]	39,2 [36,7-46,6]	45,5 [40-66,6]	< 0,001 <sup>abc</sup>
TNF- $\alpha$ (pg/dL)	13,1 [12,7-14,5]	13,1 [12,6-14,7]	13,1 [12,7-14,1]	13,3 [12,9-14,6]	0,5
IFN- $\gamma$ (pg/dL)	14,8 [13,9-17,1]	13,9 [13,4-17]	14,9 [13,9-17]	15,1 [14-18,3]	0,1
Relação IL-6 / IL-10	0,8 [0,6-1,7]	0,6 [0,5-0,6]	0,8 [0,6-1,4]	1,1 [0,7-2,7]	< 0,001 <sup>abc</sup>
Relação IL-6 / IFN- $\gamma$	2,2 [1,5, 4,5]	1,4 [1,1-1,6]	2,1 [1,5-4,3]	3,5 [2,0-8,4]	< 0,001 <sup>abc</sup>
Relação TNF- $\alpha$ / IL-10	3 [2,7-3,5]	2,8 [2,5-2,9]	2,9 [2,7-3,4]	3,3 [2,9-4,1]	< 0,001 <sup>abc</sup>
Fenilalanina (mg/dL)	1,51 [1,18-2,08]	1 [0,85-1,35]	1,5 [1,14-2,23]	1,71 [1,43-2,17]	< 0,001 <sup>ab</sup>
Histidina (mg/dL)	0,84 [0,36-1,07]	0,68 [0,22-1,03]	0,9 [0,49-1,11]	0,81 [0,35-1,03]	0,2
Ornitina (mg/dL)	0,65 [0,48-0,88]	0,59 [0,48-0,75]	0,64 [0,47-0,86]	0,68 [0,5-0,92]	0,4
Tirosina (mg/dL)	1,28 [0,94-1,60]	1,01 [0,9-1,3]	1,29 [1-1,71]	1,36 [1-1,61]	0,04 <sup>ab</sup>
Creatinina (mg/dL)	0,9 [0,7-1,3]	0,9 [0,8-1]	0,8 [0,7-1,12]	1 [0,8-1,6]	0,02 <sup>c</sup>
Taxa de filtração glomerular estimada (mL/min/1-73 $m^2$ )	88 [54-105]	95 [83-108]	91 [66-109]	75 [39-171]	0,02 <sup>bc</sup>
Creatinofosfoquinase (mg/dL)	87 [49-201]	72 [48-114]	86 [51-140]	100 [47-264]	0,2

Os dados contínuos são apresentados como mediana [<sup>1º</sup>, <sup>3º</sup> quartil]. Variáveis categóricas são apresentadas como contagens (percentuais). Comparações emparelhadas *post hoc* ( $p < 0,05$ ) em pares: <sup>a</sup> Leve vs Moderado, <sup>b</sup> Leve vs Grave, <sup>c</sup> Moderado vs Grave.



### ***3.3.1.3 - Relação entre os níveis séricos de fenilalanina e marcadores inflamatórios***

A relação entre os níveis séricos de fenilalanina e as principais citocinas inflamatórias (IL-2, IL-6 e IL-10) foi avaliada por meio de análise de regressão linear ajustada para sexo, idade, comorbidade (ICC) e grupos de gravidade da doença. A Tabela 3.9 mostra que os níveis séricos de fenilalanina estão independentemente e positivamente associados apenas à gravidade da doença, independentemente da citocina analisada

**Tabela 3.9** Modelos de regressão linear para a associação entre níveis séricos de fenilalanina e marcadores inflamatórios, ajustados para sexo, idade, comorbidade (ICC) e grupos de gravidade.

**Variável dependente:** Fenilalanina (log mg/dL)

Variáveis independentes	Modelo 1		Modelo 2		Modelo 3	
	Coefficiente padronizado $\beta$ (IC 95%)	p	Coefficiente padronizado $\beta$ (IC 95%)	p	Coefficiente padronizado $\beta$ (IC 95%)	p
IL-2 (log pg/mL)	0,06 (-0,09 – 0,21)	0,4	-	-	-	-
IL-6 (log pg/mL)	-	-	0,13 (-0,02 – 0,28)	0,08	-	-
IL-10 (log pg/mL)	-	-	-	-	0,09 (-0,06 – 0,24)	0,2
Sexo masculino	0,07 (-0,23 – 0,39)	0,1	0,09 (-0,21 – 0,4)	0,5	0,08 (-0,22 – 0,39)	0,5
Idade, anos	0,12 (-0,15 – 0,39)	0,3	0,11 (-0,6 – 0,38)	0,4	0,11 (-0,16 – 0,38)	0,4
ICC	-0,03 (-0,3 – 0,24)	0,8	-0,01 (-0,28 – 0,25)	0,9	-0,01 (0,28 – 0,25)	0,9
Gravidade da doença						
Leve	Referência	-	Referência	-	Referência	-
Moderado	0,73 (0,23 – 1,22)	0,004	0,70 (0,22 – 1,19)	0,005	0,70 (0,21 – 1,19)	0,005
Grave	0,91 (0,39 – 1,43)	< 0,001	0,85 (0,34 – 1,37)	0,001	0,86 (0,35 – 1,38)	0,001

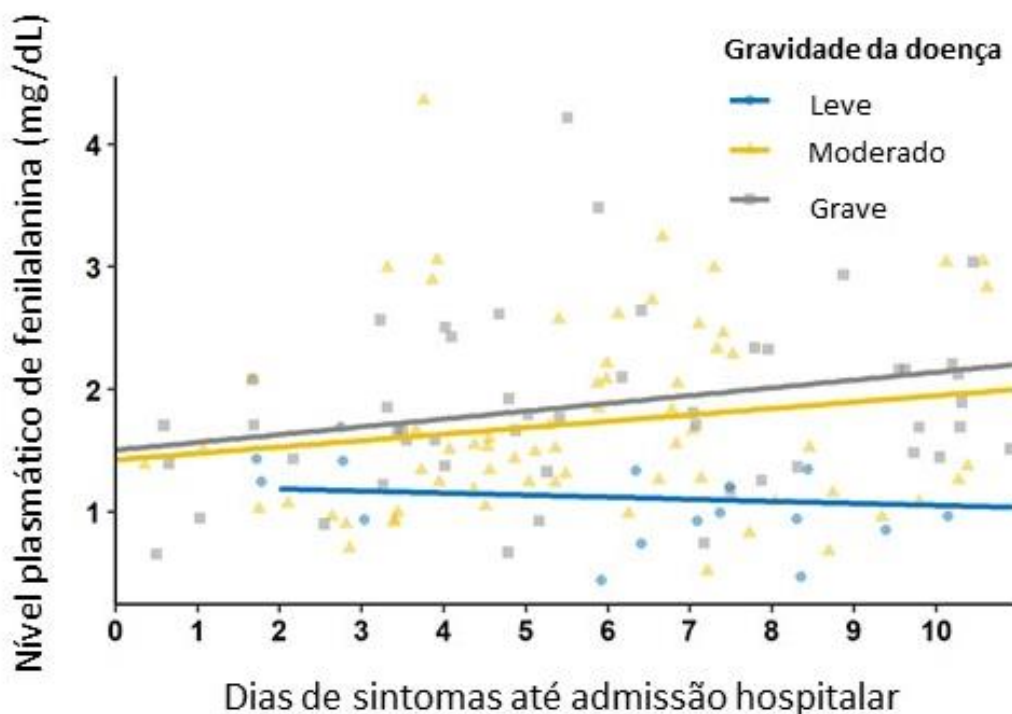
IC 95%, 95% intervalo de confiança.

ICC, Índice de comorbidade de Charlson.

### 3.3.1.4 - Níveis séricos de fenilalanina como marcador da gravidade da doença

Considerando um possível papel da fenilalanina como um marcador de gravidade da doença independente dos principais marcadores de inflamação, avaliamos ainda a evolução temporal dos níveis séricos de fenilalanina durante os primeiros dez dias do início da doença até a admissão hospitalar. A Figura. 3.7 mostra a distribuição dos níveis séricos de fenilalanina em cada grupo de gravidade da doença em função do tempo desde o início da doença até a admissão hospitalar. Na figura, os níveis séricos de fenilalanina em gravidade leve têm concentrações mais baixas e menos variáveis ao longo do tempo do que os grupos moderado e grave.

**Figura 3.7.** Distribuição dos níveis séricos de fenilalanina de acordo com o tempo de início da doença até a internação e gravidade da doença.



### 3.3.2. Discussão

Há uma tentativa cada vez maior de responder por que alguns pacientes com COVID-19 progridem para estados graves e os determinantes da velocidade em que ocorre. Nesse sentido, atualmente, existem vários estudos sobre parâmetros clínicos (Li et al., 2021), comorbidades específicas, (Fernández Villalobos et al., 2021; Pott Junior & Cominetti, 2021) parâmetros laboratoriais bioquímicos (Ciaccio & Agnello, 2020) e hematológicos (Delshad et al., 2021) e alterações inflamatórias de citocinas. (Darif et al., 2021) Mais recentemente, alguns estudos trouxeram uma nova perspectiva para COVID-19 através do prisma da metabolômica. (Casari et al., 2021; Lin et al., 2021)

Analizamos o perfil metabolômico e inflamatório de adultos com COVID-19 de acordo com a gravidade da doença. Demonstramos que a fenilalanina e a tirosina são marcadamente maiores entre os indivíduos com doença moderada a grave. Fenilalanina é um aminoácido essencial, adquirido somente pela dieta e no jejum o fluxo de fenilalanina é liberado pela quebra de proteínas sendo que níveis mais elevados de fenilalanina estão associados à proteólise corporal ou estado catabólico. (Matthews, 2007) Mostramos que a fenilalanina manteve uma associação independente com a gravidade da doença, mesmo após o ajuste para diferentes citocinas pró-inflamatórias. Essa associação é independente do tempo entre o início dos sintomas e a magnitude do estado inflamatório. Em particular, esses achados apontam para a fenilalanina como um marcador distinto da gravidade da doença.

A evidência da fenilalanina como marcador de gravidade não é nova. Um estudo realizado entre 2017 e 2018, ou seja, antes da pandemia de COVID-19, avaliou pacientes com diferentes infecções graves (SOFA  $\geq$  2), analisando os níveis plasmáticos de fenilalanina, leucina, proteína C reativa (PCR) e índices nutricionais (albumina, pré-albumina e transferrina) e monitorou seus resultados por três meses. (Huang et al., 2019) A fenilalanina foi associada a maiores taxas de mortalidade, admissão em UTI, escores SOFA, episódios de bacteremia, níveis de PCR e níveis mais baixos de pré-albumina, transferrina e leucina. Ao dividir os pacientes de acordo com os níveis de fenilalanina, os participantes com níveis mais elevados de fenilalanina apresentaram maiores escores SOFA, taxas de admissão na UTI e níveis de PCR e leucina. (Huang et al., 2019) No entanto,

este estudo não analisou a relação dos níveis de fenilalanina com marcadores inflamatórios levando em consideração possíveis fatores de confusão em um modelo multivariado.

Apesar disso, a fenilalanina parece ser um marcador de gravidade relacionado a dificuldade respiratória. Recentemente, Xu et al. mostraram que pacientes com síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) têm perfis metabólicos significativamente diferentes dos controles saudáveis. (Xu et al., 2020) De acordo com seus resultados, os níveis de fenilalanina, D-fenilalanina e fenilacetilglutamina foram maiores entre os não sobreviventes. O metabolismo da fenilalanina foi a via mais notavelmente alterada entre os não sobreviventes e sobreviventes. Experimentos com animais in vivo também mostraram que níveis mais elevados de fenilalanina foram associados a lesão pulmonar grave e aumento da mortalidade por SDRA. Além disso, Chen et al. relataram recentemente que a fenilalanina previu mortalidade em pacientes criticamente enfermos com insuficiência cardíaca aguda ou IC crônica agudizada. (Chen et al., 2020) Na análise multivariada, níveis de fenilalanina  $\geq 112 \mu\text{M}$  previram morte em um ano, independentemente da idade, escores de avaliação da fisiologia aguda e da saúde crônica (APACHE II), SOFA, fibrilação atrial, proteína C reativa, colesterol, pré-albumina, transferrina, IL-8 e IL-10. Assim, evidências apontam para a fenilalanina como um marcador de gravidade da doença, especialmente relacionada ao desconforto respiratório.

A característica respiratória dominante da COVID-19 é o agravamento progressivo da hipoxemia arterial, eventualmente levando à SDRA. Para tanto, a classificação de gravidade proposta pela OMS reflete diferentes achados clínicos e laboratoriais, respostas à terapia e evolução clínica. (Siddiqi & Mehra, 2020; WHO, 2021) No entanto, a maioria desses marcadores de classe são inespecíficos e compartilham semelhanças com outras condições inflamatórias e respiratórias. Assim, estudos anteriores usando análise metabólica de RMN mostraram várias anormalidades ao comparar pacientes COVID-19 a indivíduos saudáveis, incluindo a redução em alguns aminoácidos essenciais (metionina, isoleucina, histidina, lisina, tirosina e glutamina) e níveis aumentados de fenilalanina (81%) e ácido 2-hidroxi-butírico, sugerindo uma condição de estresse metabólico causado pela COVID-19. (Bruzzzone et al., 2020)

A análise não direcionada de pacientes não críticos COVID-19 demonstrou que a biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano, metabolismo de fenilalanina, degradação de aminoacil-tRNA (ácido ribonucleico transportador), metabolismo de ácido araquidônico e ciclo de ácido tricarbóxico foram as vias metabólicas mais importantes afetadas pela infecção pelo SARS-CoV-2. (Barberis et al., 2020) Um estudo metabólico em escala genômica complementou esses achados, revelando um fluxo de fenilalanina significativamente maior entre pacientes falecidos COVID-19. Ele sugeriu que o uso de resíduos de fenilalanina para a produção de proteínas virais e sua subsequente montagem em partículas virais estariam de alguma forma relacionados à gravidade da doença. (Mei et al., 2021)

Nossos resultados corroboram com a associação significativa entre níveis mais elevados de fenilalanina e gravidade do COVID-19. (Dierckx et al., 2020) Essa associação também está de acordo com relatos de baixa ocorrência de COVID-19 grave entre pacientes com fenilcetonúria, o que foi anteriormente atribuído a baixa incidência de deficiência de vitamina D nesses pacientes devido ao uso de substitutos de proteína em sua dieta. (Rocha et al., 2020) Um dos nossos pontos fortes foi demonstrar essa associação independente do tempo decorrido entre o início dos sintomas e da magnitude do estado inflamatório. No entanto, o papel da fenilalanina no ciclo viral e o impacto da alteração de seus níveis no agravamento da gravidade da doença ainda são desconhecidos.

Os parâmetros metabólicos e inflamatórios registrados uma vez na admissão hospitalar, direcionam para medições consecutivas e podem fornecer dados mais fidedignos da dinâmica entre os estados metabólicos e inflamatórios e a gravidade da doença. Portanto, há poucas informações disponíveis sobre as variações nos níveis de fenilalanina durante a hospitalização e deterioração respiratória.

No entanto, neste estudo observamos um quadro significativo da relação entre os níveis de fenilalanina e marcadores inflamatórios em pacientes adultos com COVID-19, considerando a gravidade da doença e as principais características da via metabólica da fenilalanina. Considerando que o rastreamento da fenilalanina sérica é um exame de sangue bem conhecido para o diagnóstico de fenilcetonúria em recém-nascidos, acreditamos que estratégias

futuras podem permitir a medição rápida e prática dos níveis de fenilalanina após extensa validação da fenilalanina como um biomarcador relacionado ao COVID-19.

Neste sentido, o acompanhamento destes pacientes ao longo do tempo será relevante para avaliar o desempenho diagnóstico dos níveis de fenilalanina como marcador de gravidade da doença, e ser objeto de análises futuras. Mostramos que a fenilalanina é um marcador de gravidade da doença e essa associação é independente do tempo entre o início dos sintomas e a magnitude do estado inflamatório. Estes resultados podem contribuir e ajudar a compreender melhor as vias metabólicas e inflamatórias envolvidas no COVID-19 e oferecer novos *insights* fisiopatológicos sobre a interação entre a inflamação e o metabolismo no COVID-19.

## **Capítulo 4 – Conclusões**

Desta forma foi possível estabelecer biomarcadores que estão associados à gravidade de pacientes adultos com COVID-19. Podemos citar as interleucinas 6 e 10 associadas a maior gravidade e maiores escores de comorbidades em pacientes idosos com COVID-19; as transaminases hepáticas como marcadores complementares de gravidade em pacientes com COVID-19; e, a fenilalanina como metabólito independente associado à gravidade da COVID-19 e potencial marcador prognóstico.

A detecção desses biomarcadores poderá contribuir futuramente na análise da gravidade dos quadros de COVID-19 e auxiliar na melhor condução dos casos pelas equipes de saúde responsáveis.

Futuros estudos são necessários para novas análises, dado que nossos dados são de uma fase inicial da pandemia, previamente a vacinação contra o SARS-CoV-2 e antecedendo as novas variantes do vírus.



## Referências

- Abers, M. S., Delmonte, O. M., Ricotta, E. E., Fintzi, J., Fink, D. L., Almeida de Jesus, A. A., Zarembek, K. A., Alehashemi, S., Oikonomou, V., Desai, J. V., Canna, S. W., Shakoory, B., Dobbs, K., Imberti, L., Sottini, A., Quiros-Roldan, E., Castelli, F., Rossi, C., Brugnani, D., ... Notarangelo, L. D. (2021). An immune-based biomarker signature is associated with mortality in COVID-19 patients. *JCI Insight*, 6(1). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.144455>
- Akbari, H., Tabrizi, R., Lankarani, K. B., Aria, H., Vakili, S., Asadian, F., Noroozi, S., Keshavarz, P., & Faramarz, S. (2020). The role of cytokine profile and lymphocyte subsets in the severity of coronavirus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. *Life Sciences*, 258(January), 118167. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118167>
- Ali, N. (2020). Relationship Between COVID-19 Infection and Liver Injury: A Review of Recent Data. *Frontiers in Medicine*, 7(July), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00458>
- Ali, N., & Hossain, K. (2020). Liver injury in severe COVID-19 infection: current insights and challenges. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*, 0(0). <https://doi.org/10.1080/17474124.2020.1794812>
- Almas, T., Ehtesham, M., Khedro, T., Haadi, A., Nabeel, A. R., Hussain, S., Alsufyani, R., Al-Awaid, A. H., Sclair, S., & Mansoor, E. (2021). The many faces of coronavirus disease 2019: COVID-19 and the liver. *Annals of Medicine and Surgery*, 64(February), 2019–2022. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2021.102224>
- Alqahtani, S. A., & Schattenberg, J. M. (2020). Liver injury in COVID-19: The current evidence. *United European Gastroenterology Journal*, 8(5), 509–519. <https://doi.org/10.1177/2050640620924157>
- Barberis, E., Timo, S., Amede, E., Vanella, V. V., Puricelli, C., Cappellano, G., Raineri, D., Cittone, M. G., Rizzi, E., Pedrinelli, A. R., Vassia, V., Casciaro, F. G., Priora, S., Nerici, I., Galbiati, A., Hayden, E., Falasca, M., Vaschetto, R., Sainaghi, P. P., ... Manfredi, M. (2020). Large-scale plasma analysis revealed new mechanisms and molecules associated with the host response to sars-cov-2. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 1–25. <https://doi.org/10.3390/ijms21228623>
- Barek, M. A., Aziz, M. A., & Islam, M. S. (2020). Impact of age, sex, comorbidities and clinical symptoms on the severity of COVID-19 cases: A meta-analysis with 55 studies and 10014 cases. *Heliyon*, 6(12), 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05684>
- Biswas, M., Rahaman, S., Biswas, T. K., Haque, Z., & Ibrahim, B. (2021). Association of Sex, Age, and Comorbidities with Mortality in COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Intervirology*, 64(1), 36–47. <https://doi.org/10.1159/000512592>
- Blanco-Melo, D., Nilsson-Payant, B. E., Liu, W.-C., Uhl, S., Hoagland, D., Møller, R., Jordan, T. X., Oishi, K., Panis, M., Sachs, D., Wang, T. T., Schwartz, R. E., Lim, J. K., Albrecht, R. A., & TenOever, B. R. (2020).

Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*, 181(5), 1036-1045.e9.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.026>

- Bruzzone, C., Bizkarguenaga, M., Gil-Redondo, R., Diercks, T., Arana, E., García de Vicuña, A., Seco, M., Bosch, A., Palazón, A., San Juan, I., Laín, A., Gil-Martínez, J., Bernardo-Seisdedos, G., Fernández-Ramos, D., Lopitz-Otsoa, F., Embade, N., Lu, S., Mato, J. M., & Millet, O. (2020). SARS-CoV-2 Infection Dysregulates the Metabolomic and Lipidomic Profiles of Serum. *IScience*, 23(10).  
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101645>
- Casari, I., Manfredi, M., Metharom, P., & Falasca, M. (2021). Dissecting lipid metabolism alterations in SARS-CoV-2. *Progress in Lipid Research*, 82(January), 101092. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101092>
- Castle, S. C. (2000). Clinical Relevance of Age-Related Immune Dysfunction. *Clinical Infectious Diseases*, 31, 578–585.
- Cevik, M., Tate, M., Lloyd, O., Maraolo, A. E., Schafers, J., & Ho, A. (2021). SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Microbe*, 2(1), e13–e22. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30172-5](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30172-5)
- Charlson, M. E., Pompei, P., Ales, K. L., & MacKenzie, C. R. (1987). A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: Development and validation. In *Journal of Chronic Diseases* (Vol. 40, Issue 5, pp. 373–383). [https://doi.org/10.1016/0021-9681\(87\)90171-8](https://doi.org/10.1016/0021-9681(87)90171-8)
- Chen, W., Wang, C., Cheng, C., Liu, M., Chu, C., Wu, H., Huang, P., Lin, Y., Ko, T., Chen, W., Wang, H., Lee, S., & Liang, C. (2020). Elevated plasma phenylalanine predicts mortality in critical patients with heart failure. *ESC Heart Failure*, 7(5), 2884–2893. <https://doi.org/10.1002/ehf2.12896>
- Chen, Y., Zheng, Y., Yu, Y., Wang, Y., Huang, Q., Qian, F., Sun, L., Song, Z., Chen, Z., Feng, J., An, Y., Yang, J., Su, Z., Sun, S., Dai, F., Chen, Q., Lu, Q., Li, P., Ling, Y., ... Zhang, Y. (2020). Blood molecular markers associated with COVID-19 immunopathology and multi-organ damage. *The EMBO Journal*, 39(24), 1–23. <https://doi.org/10.15252/embj.2020105896>
- Ciaccio, M., & Agnello, L. (2020). Biochemical biomarkers alterations in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Diagnosis*, 7(4), 365–372. <https://doi.org/10.1515/dx-2020-0057>
- Copaescu, A., Smibert, O., Gibson, A., Phillips, E. J., & Trubiano, J. A. (2020). The role of IL-6 and other mediators in the cytokine storm associated with SARS-CoV-2 infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 146(3), 518-534.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.07.001>
- D'Amico, F., Baumgart, D. C., Danese, S., & Peyrin-Biroulet, L. (2020). Diarrhea during COVID-19 infection: pathogenesis, epidemiology, prevention and management. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, May, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2020.04.001>

- Darif, D., Hammi, I., Kihel, A., El Idrissi Saik, I., Guessous, F., & Akarid, K. (2021). The pro-inflammatory cytokines in COVID-19 pathogenesis: What goes wrong? *Microbial Pathogenesis*, 153(February), 104799. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104799>
- De Biasi, S., Meschiari, M., Gibellini, L., Bellinazzi, C., Borella, R., Fidanza, L., Gozzi, L., Iannone, A., Lo Tartaro, D., Mattioli, M., Paolini, A., Menozzi, M., Milić, J., Franceschi, G., Fantini, R., Tonelli, R., Sita, M., Sarti, M., Trenti, T., ... Cossarizza, A. (2020). Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nature Communications*, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17292-4>
- Delshad, M., Tavakolinia, N., Pourbagheri-Sigaroodi, A., Safaroghli-Azar, A., Bagheri, N., & Bashash, D. (2021). The contributory role of lymphocyte subsets, pathophysiology of lymphopenia and its implication as prognostic and therapeutic opportunity in COVID-19. *International Immunopharmacology*, 95(January). <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107586>
- Dierckx, T., Elslande, J. Van, Salmela, H., Decru, B., Wauters, E., Gunst, J., Herck, Y. Van, Wauters, J., & Stessel, B. (2020). *The metabolic fingerprint of COVID-19 severity KU Leuven , Department of Chronic Diseases and Metabolism , Laboratory of Respiratory Diseases and Thoracic Surgery ( BREATHE ), Leuven , Belgium.*
- Ding, Z. yang, Li, G. xun, Chen, L., Shu, C., Song, J., Wang, W., Wang, Y. wei, Chen, Q., Jin, G. nan, Liu, T. tong, Liang, J. nan, Zhu, P., Zhu, W., Li, Y., Zhang, B. hao, Feng, H., Zhang, W. guang, Yin, Z. yu, Yu, W. kui, ... Zhang, B. (2021). Association of liver abnormalities with in-hospital mortality in patients with COVID-19. *Journal of Hepatology*, 74(6), 1295–1302. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.12.012>
- Donald Voet, Judith G. Voet, C., & Pratt, W. (2014). *Fundamentos de bioquímica* (Artmed (ed.); 4a.).
- Fernández Villalobos, N. V., Ott, J. J., Klett-Tammen, C. J., Bockey, A., Vanella, P., Krause, G., & Lange, B. (2021). Effect modification of the association between comorbidities and severe course of COVID-19 disease by age of study participants: a systematic review and meta-analysis. *Systematic Reviews*, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13643-021-01732-3>
- Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., & De Benedictis, G. (2000). Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 908, 244–254. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x>
- Fuentes, E., Fuentes, M., Alarcón, M., & Palomo, I. (2017). Immune system dysfunction in the elderly. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 89(1), 285–299. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160487>
- Fulop, T., Witkowski, J. M., Olivieri, F., & Larbi, A. (2018). The integration of inflammaging in age-related diseases. *Seminars in Immunology*, 40(September), 17–35. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.09.003>

- Gaffen, S. L., & Liu, K. D. (2004). Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine*, *28*(3), 109–123. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2004.06.010>
- Gao, F., Zheng, K. I., Wang, X. B., Yan, H. D., Sun, Q. F., Pan, K. H., Wang, T. Y., Chen, Y. P., George, J., & Zheng, M. H. (2021). Metabolic associated fatty liver disease increases coronavirus disease 2019 disease severity in nondiabetic patients. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, *36*(1), 204–207. <https://doi.org/10.1111/jgh.15112>
- Goodman, K. E., Magder, L. S., Baghdadi, J. D., Pineles, L., Levine, A. R., Perencevich, E. N., & Harris, A. D. (2021). Impact of Sex and Metabolic Comorbidities on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Mortality Risk Across Age Groups: 66 646 Inpatients Across 613 U.S. Hospitals. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *73*(11), e4113–e4123. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1787>
- Guan, W., Ni, Z., Hu, Y., Liang, W., Ou, C., He, J., Liu, L., Shan, H., Lei, C., Hui, D. S. C., Du, B., Li, L., Zeng, G., Yuen, K.-Y., Chen, R., Tang, C., Wang, T., Chen, P., Xiang, J., ... Zhong, N. (2020). Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine*, *382*(18), 1708–1720. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2002032>
- Han, H., Ma, Q., Li, C., Liu, R., Zhao, L., Wang, W., Zhang, P., Liu, X., Gao, G., Liu, F., Jiang, Y., Cheng, X., Zhu, C., & Xia, Y. (2020). Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. *Emerging Microbes and Infections*, *9*(1), 1123–1130. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1770129>
- Hashizume, M. (2020). Outlook of IL-6 signaling blockade for COVID-19 pneumonia. *Inflammation and Regeneration*, *40*(1). <https://doi.org/10.1186/s41232-020-00134-7>
- Hofmann, S. R., Rösen-Wolff, A., Tsokos, G. C., & Hedrich, C. M. (2012). Biological properties and regulation of IL-10 related cytokines and their contribution to autoimmune disease and tissue injury. *Clinical Immunology*, *143*(2), 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2012.02.005>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, *395*(10223), 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- Huang, S.-S., Lin, J.-Y., Chen, W.-S., Liu, M.-H., Cheng, C.-W., Cheng, M.-L., & Wang, C.-H. (2019). Phenylalanine- and leucine-defined metabolic types identify high mortality risk in patients with severe infection. *International Journal of Infectious Diseases*, *85*, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.05.030>
- Lucif Junior, N., & Rocha, J. S. Y. (2004). Study of inequalities in hospital mortality using the Charlson comorbidity index. *Revista de Saude Publica*, *38*(6), 780–786. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15608895>

- Izcovich, A., Ragusa, M. A., Tortosa, F., Marzio, M. A. L., Agnoletti, C., Bengolea, A., Ceirano, A., Espinosa, F., Saavedra, E., Sanguine, V., Tassara, A., Cid, C., Catalano, H. N., Agarwal, A., Foroutan, F., & Rada, G. (2020). Prognostic factors for severity and mortality in patients infected with COVID-19: A systematic review. *PLoS ONE*, *15*(11 November), 1–30. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241955>
- Jacob, M., Lopata, A. L., Dasouki, M., & Abdel Rahman, A. M. (2019). Metabolomics toward personalized medicine. *Mass Spectrometry Reviews*, *38*(3), 221–238. <https://doi.org/10.1002/mas.21548>
- Johnson, C. H., Ivanisevic, J., & Siuzdak, G. (2016). Metabolomics: Beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(7), 451–459. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.25>
- Jothimani, D., Venugopal, R., Abedin, M. F., Kaliamoorthy, I., & Rela, M. (2020). COVID-19 and the liver. *Journal of Hepatology*, *73*(5), 1231–1240. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.06.006>
- Kang, S. J., & Jung, S. I. (2020). Age-Related Morbidity and Mortality among Patients with COVID-19. *Infection and Chemotherapy*, *52*(2), 154–164. <https://doi.org/10.3947/ic.2020.52.2.154>
- Kullar, R., Patel, A. P., & Saab, S. (2020). Hepatic injury in patients with COVID-19. *Journal of Clinical Gastroenterology*, *54*(10), 841–849. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000001432>
- Kwo, P. Y., Cohen, S. M., & Lim, J. K. (2017). ACG Clinical Guideline: Evaluation of Abnormal Liver Chemistries. *American Journal of Gastroenterology*, *112*(1), 18–35. <https://doi.org/10.1038/ajg.2016.517>
- Lambden, S., Laterre, P. F., Levy, M. M., & Francois, B. (2019). The SOFA score - Development, utility and challenges of accurate assessment in clinical trials. *Critical Care*, *23*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2663-7>
- Li, J., Huang, D. Q., Zou, B., Yang, H., Hui, W. Z., Rui, F., Yee, N. T. S., Liu, C., Nerurkar, S. N., Kai, J. C. Y., Teng, M. L. P., Li, X., Zeng, H., Borghi, J. A., Henry, L., Cheung, R., & Nguyen, M. H. (2021). Epidemiology of COVID-19: A systematic review and meta-analysis of clinical characteristics, risk factors, and outcomes. *Journal of Medical Virology*, *93*(3), 1449–1458. <https://doi.org/10.1002/jmv.26424>
- Li, Y., & Xiao, S. Y. (2020). Hepatic involvement in COVID-19 patients: Pathology, pathogenesis, and clinical implications. *Journal of Medical Virology*, *92*(9), 1491–1494. <https://doi.org/10.1002/jmv.25973>
- Liao, W., Lin, J. X., & Leonard, W. J. (2011). IL-2 family cytokines: New insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Current Opinion in Immunology*, *23*(5), 598–604. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.08.003>
- Lin, B., Liu, J., Liu, Y., & Qin, X. (2021). Progress in understanding COVID-19: insights from the omics approach. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, *58*(4), 242–252. <https://doi.org/10.1080/10408363.2020.1851167>

- Liu, J., Li, S., Liu, J., Liang, B., Wang, X., Wang, H., Li, W., Tong, Q., Yi, J., Zhao, L., Xiong, L., Guo, C., Tian, J., Luo, J., Yao, J., Pang, R., Shen, H., Peng, C., Liu, T., ... Zheng, X. (2020). Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine*, 55(December 2019). <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102763>
- Lu, L., Zhang, H., Dauphars, D. J., & He, Y. W. (2021). A Potential Role of Interleukin 10 in COVID-19 Pathogenesis. *Trends in Immunology*, 42(1), 3–5. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.012>
- Luporini, R. L., Pott-Junior, H., Di Medeiros Leal, M. C. B., Castro, A., Ferreira, A. G., Cominetti, M. R., & de Freitas Anibal, F. (2021). Phenylalanine and COVID-19: Tracking disease severity markers. *International Immunopharmacology*, 101(PA), 108313. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108313>
- Luporini, R. L., Rodolpho, J. M. D. A., Kubota, L. T., Martin, A. C. B. M., Cominetti, M. R., Anibal, F. de F., & Pott-Junior, H. (2021). IL-6 and IL-10 are associated with disease severity and higher comorbidity in adults with COVID-19. *Cytokine*, 143(January), 155507. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155507>
- Maggio, M., Guralnik, J. M., Longo, D. L., & Ferrucci, L. (2006). Interleukin-6 in aging and chronic disease: A magnificent pathway. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 61(6), 575–584. <https://doi.org/10.1093/gerona/61.6.575>
- Magro, F., Abreu, C., & Rahier, J. F. (2020). The daily impact of COVID-19 in gastroenterology. *United European Gastroenterology Journal*. <https://doi.org/10.1177/2050640620920157>
- Mao, R., Qiu, Y., He, J.-S., Tan, J.-Y., Li, X.-H., Liang, J., Shen, J., Zhu, L.-R., Chen, Y., Iacucci, M., Ng, S. C., Ghosh, S., & Chen, M.-H. (2020). Manifestations and prognosis of gastrointestinal and liver involvement in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 1253(20). [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30126-6](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30126-6)
- Marjot, T., Moon, A. M., Cook, J. A., Abd-Elsalam, S., Aloman, C., Armstrong, M. J., Pose, E., Brenner, E. J., Cargill, T., Catana, M. A., Dhanasekaran, R., Eshraghian, A., García-Juárez, I., Gill, U. S., Jones, P. D., Kennedy, J., Marshall, A., Matthews, C., Mells, G., ... Webb, G. J. (2021). Outcomes following SARS-CoV-2 infection in patients with chronic liver disease: An international registry study. *Journal of Hepatology*, 74(3), 567–577. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.09.024>
- Matthews, D. E. (2007). An Overview of Phenylalanine and Tyrosine Kinetics in Humans. *The Journal of Nutrition*, 137(6), 1549S-1555S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1549S>
- Meftahi, G. H., Jangravi, Z., Sahraei, H., & Bahari, Z. (2020). The possible pathophysiology mechanism of cytokine storm in elderly adults with COVID-19 infection: the contribution of “inflammation-aging.” *Inflammation*

- Research*, 69(9), 825–839. <https://doi.org/10.1007/s00011-020-01372-8>
- Mei, Q., Wang, A. Y., Bryant, A., Yang, Y., Li, M., Wang, F., Du, S., Kurts, C., Wu, P., Ma, K., Wu, L., Chen, H., Luo, J., Li, Y., Hu, G., Yuan, X., & Li, J. (2021). Survival Factors and Metabolic Pathogenesis in Elderly Patients (≥65) With COVID-19: A Multi-Center Study. *Frontiers in Medicine*, 7(January). <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.595503>
- Mi, J., Zhong, W., Huang, C., Zhang, W., Tan, L., & Ding, L. (2020). Gender, age and comorbidities as the main prognostic factors in patients with COVID-19 pneumonia. *American Journal of Translational Research*, 12(10), 6537–6548.
- Michaud, M., Balardy, L., Moulis, G., Gaudin, C., Peyrot, C., Vellas, B., Cesari, M., & Nourhashemi, F. (2013). Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. *Journal of the American Medical Directors Association*, 14(12), 877–882. <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2013.05.009>
- Miller, I. F., Becker, A. D., Grenfell, B. T., & Metcalf, C. J. E. (2020). Disease and healthcare burden of COVID-19 in the United States. *Nature Medicine*, 26(8), 1212–1217. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0952-y>
- Monkemüller, K., Fry, L., & Rickes, S. (2020). Covid-19, Coronavirus, SARS-CoV-2 and the small bowel. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 112(4), 383–388. <https://doi.org/10.17235/reed.2020.7137/2020>
- Naing, A., Papadopoulos, K. P., Autio, K. A., Ott, P. A., Patel, M. R., Wong, D. J., Falchook, G. S., Pant, S., Whiteside, M., Rasco, D. R., Mumm, J. B., Chan, I. H., Bendell, J. C., Bauer, T. M., Colen, R. R., Hong, D. S., Van Vlasselaer, P., Tannir, N. M., Oft, M., & Infante, J. R. (2016). Safety, antitumor activity, and immune activation of pegylated recombinant human interleukin-10 (AM0010) in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 34(29), 3562–3569. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.68.1106>
- Nardo, A. D., Schneeweiss-Gleixner, M., Bakail, M., Dixon, E. D., Lax, S. F., & Trauner, M. (2021). Pathophysiological mechanisms of liver injury in COVID-19. *Liver International*, 41(1), 20–32. <https://doi.org/10.1111/liv.14730>
- Oliveira, A. P. A. de, Urbanetto, J. de S., & Caregnato, R. C. A. (2020). *National Early Warning Score 2: adaptação transcultural para o português do Brasil. Revista Gaúcha de Enfermagem*, 41, e20190424. <http://www.scielo.br/j/rgenf/a/Wc46R8wyJdLrGyffZQQQCcw/?lang=pt>
- Pan, L., Huang, P., Xie, X., Xu, J., Guo, D., & Jiang, Y. (2021). Metabolic associated fatty liver disease increases the severity of COVID-19: A meta-analysis. *Digestive and Liver Disease*, 53(2), 153–157. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2020.09.007>
- Pasrija, R., & Naime, M. (2021). The deregulated immune reaction and cytokines release storm (CRS) in COVID-19 disease. *International Immunopharmacology*, 90(January), 107225. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107225>

- Ponnappan, S., & Ponnappan, U. (2011). Aging and immune function: Molecular mechanisms to interventions. *Antioxidants and Redox Signaling*, *14*(8), 1551–1585. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3228>
- Portincasa, P., Krawczyk, M., Machill, A., Lammert, F., & Di Ciaula, A. (2020). Hepatic consequences of COVID-19 infection. Lapping or biting? *European Journal of Internal Medicine*, *77*(April), 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2020.05.035>
- Pott-Junior, H., Bittencourt, N. Q. P., Chacha, S. F. G., Luporini, R. L., Cominetti, M. R., & Anibal, F. de F. (2021). Elevations in Liver Transaminases in COVID-19: (How) Are They Related? *Frontiers in Medicine*, *8*(July), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.705247>
- Pott Junior, H., & Cominetti, M. R. (2021). Comorbidities predict 30-day hospital mortality of older adults with COVID-19. *Geriatric Nursing*, *42*(5), 1024–1028. <https://doi.org/10.1016/j.gerinurse.2021.06.011>
- Qin, Z. J., Liu, L., Sun, Q., Li, X., Luo, J. F., Liu, J. S., & Liu, D. (2020). Impaired immune and coagulation systems may be early risk factors for COVID-19 patients: A retrospective study of 118 inpatients from Wuhan, China. *Medicine*, *99*(35), e21700. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000021700>
- Ramos-Casals, M., Brito-Zerón, P., & Mariette, X. (2021). Systemic and organ-specific immune-related manifestations of COVID-19. *Nature Reviews Rheumatology*, *17*(6), 315–332. <https://doi.org/10.1038/s41584-021-00608-z>
- Rocha, J. C., Calhau, C., & MacDonald, A. (2020). Reply to Jakovac; Severity of COVID-19 infection in patients with phenylketonuria: Is vitamin D status protective? *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *318*(6), E890–E891. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00195.2020>
- Rockwood, K., Song, X., MacKnight, C., Bergman, H., Hogan, D. B., McDowell, I., & Mitnitski, A. (2005). A global clinical measure of fitness and frailty in elderly people. *Cmaj*, *173*(5), 489–495. <https://doi.org/10.1503/cmaj.050051>
- Rodrigues, M. K., Nunes Rodrigues, I., Vasconcelos Gomes da Silva, D. J., de S Pinto, J. M., & Oliveira, M. F. (2021). Clinical Frailty Scale: Translation and Cultural Adaptation into the Brazilian Portuguese Language. *The Journal of Frailty & Aging*, *10*(1), 38–43. <https://doi.org/10.14283/jfa.2020.7>
- Rojas, J. M., Avia, M., Martín, V., & Sevilla, N. (2017). IL-10: A multifunctional cytokine in viral infections. *Journal of Immunology Research*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/6104054>
- Royal College of Physicians. (2020). National Early Warning Score (NEWS) 2 Standardising the assessment of acute-illness severity in the NHS: Additional Implementation Guidance. *Rcplondon.Ac.Uk, March*. <https://www.rcplondon.ac.uk/projects/outputs/national-early-warning-score-news>
- Saini, R. K., Saini, N., Ram, S., Soni, S. L., Suri, V., Malhotra, P., Kaur, J.,



- Verma, I., Sharma, S., & Zohmangaihi, D. (2020). COVID-19 associated variations in liver function parameters: a retrospective study. *Postgraduate Medical Journal, March*, postgradmedj-2020-138930. <https://doi.org/CRP> has been shown to be an important inflammatory marker of severity in patients with COVID-19.
- Sanada, F., Taniyama, Y., Muratsu, J., Otsu, R., Shimizu, H., Rakugi, H., & Morishita, R. (2018). Source of Chronic Inflammation in Aging. *Frontiers in Cardiovascular Medicine, 5*(February), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00012>
- Shi, D., Yan, R., Lv, L., Jiang, H., Lu, Y., Sheng, J., Xie, J., Wu, W., Xia, J., Xu, K., Gu, S., Chen, Y., Huang, C., Guo, J., Du, Y., & Li, L. (2021). The serum metabolome of COVID-19 patients is distinctive and predictive. *Metabolism: Clinical and Experimental, 118*, 154739. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2021.154739>
- Siddiqi, H. K., & Mehra, M. R. (2020). COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical–therapeutic staging proposal. *Journal of Heart and Lung Transplantation, 39*(5), 405–407. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2020.03.012>
- Silva, E., & Othero, J. B. (2004). Consenso Brasileiro de Sepse. *Revista Brasileira Terapia Intensiva, 16*(2), 96–256.
- Sohrabi, C., Alsafi, Z., O'Neill, N., Khan, M., Kerwan, A., Al-Jabir, A., Iosifidis, C., & Agha, R. (2020). World Health Organization declares global emergency: A review of the 2019 novel coronavirus (COVID-19). *International Journal of Surgery, 76*(February), 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2020.02.034>
- Song, J. W., Lam, S. M., Fan, X., Cao, W. J., Wang, S. Y., Tian, H., Chua, G. H., Zhang, C., Meng, F. P., Xu, Z., Fu, J. L., Huang, L., Xia, P., Yang, T., Zhang, S., Li, B., Jiang, T. J., Wang, R., Wang, Z., ... Shui, G. (2020). Omics-Driven Systems Interrogation of Metabolic Dysregulation in COVID-19 Pathogenesis. *Cell Metabolism, 32*(2), 188-202.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.06.016>
- Tian, D., & Ye, Q. (2020). Hepatic complications of COVID-19 and its treatment. *Journal of Medical Virology, 92*(10), 1818–1824. <https://doi.org/10.1002/jmv.26036>
- Tilg, H., Van Montfrans, C., Van den Ende, A., Kaser, A., Van Deventer, S. J. H., Schreiber, S., Gregor, M., Ludwiczek, O., Rutgeerts, P., Gasche, C., Koningsberger, J. C., Abreu, L., Kuhn, I., Cohard, M., LeBeaut, A., Grint, P., & Weiss, G. (2002). Treatment of Crohn's disease with recombinant human interleukin 10 induces the proinflammatory cytokine interferon  $\gamma$ . *Gut, 50*(2), 191–195. <https://doi.org/10.1136/gut.50.2.191>
- Vembadi, A., Menachery, A., & Qasaimeh, M. A. (2019). Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 7*(JUN). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00147>

- Vincent, J. L., Moreno, R., Takala, J., Willatts, S., De Mendonça, A., Bruining, H., Reinhart, C. K., Suter, P. M., & Thijs, L. G. (1996). The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Medicine*, *22*(7), 707–710. <https://doi.org/10.1007/BF01709751>
- Wang, D., Hu, B., Hu, C., Zhu, F., Liu, X., Zhang, J., Wang, B., Xiang, H., Cheng, Z., Xiong, Y., Zhao, Y., Li, Y., Wang, X., & Peng, Z. (2020). Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *323*(11), 1061–1069. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>
- WHO. (2021). Living Guidance for clinical management of COVID-19 23 November 2021. *World Health Organization*, November, 63. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-clinical-2021-1>
- Wu, Y., Li, H., Guo, X., Yoshida, E. M., Mendez-Sanchez, N., Levi Sandri, G. B., Teschke, R., Romeiro, F. G., Shukla, A., & Qi, X. (2020). Incidence, risk factors, and prognosis of abnormal liver biochemical tests in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis. *Hepatology International*, *14*(5), 621–637. <https://doi.org/10.1007/s12072-020-10074-6>
- Wu, Y., Ma, Z., Guo, X., Li, H., Tang, Y., Meng, H., Yu, H., Peng, C., Chu, G., Wang, X., Teng, Y., Zhang, Q., Zhu, T., Wang, B., Tong, Z., Feng, R., Zhao, H., Lu, H., & Qi, X. (2021). Characteristics and in-hospital outcomes of COVID-19 patients with abnormal liver biochemical tests. *Annals of Hepatology*, *24*, 0–2. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2021.100349>
- Xiao, F., Tang, M., Zheng, X., Liu, Y., Li, X., & Shan, H. (2020). Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology*, *158*(6), 1831-1833.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.055>
- Xu, J., Pan, T., Qi, X., Tan, R., Wang, X., Liu, Z., Tao, Z., Qu, H., Zhang, Y., Chen, H., Wang, Y., Zhang, J., Wang, J., & Liu, J. (2020). Increased mortality of acute respiratory distress syndrome was associated with high levels of plasma phenylalanine. *Respiratory Research*, *21*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01364-6>
- Yazdanpanah, F., Hamblin, M. R., & Rezaei, N. (2020). The immune system and COVID-19: Friend or foe? *Life Sciences*, *256*(January), 117900. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117900>
- Yip, T. C. F., Lui, G. C. Y., Wong, V. W. S., Chow, V. C. Y., Ho, T. H. Y., Li, T. C. M., Tse, Y. K., Hui, D. S. C., Chan, H. L. Y., & Wong, G. L. H. (2021). Liver injury is independently associated with adverse clinical outcomes in patients with COVID-19. *Gut*, *70*(4), 733–742. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-321726>
- Zheng, H., Jin, S., Li, T., Ying, W., Ying, B., Chen, D., Ning, J., Zheng, C., Li, Y., Li, C., Chen, C., Li, X., & Gao, H. (2021). Metabolomics reveals sex-specific metabolic shifts and predicts the duration from positive to negative in non-severe COVID-19 patients during recovery process. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *19*, 1863–1873.

<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.03.039>

Zhong, P., Xu, J., Yang, D., Shen, Y., Wang, L., Feng, Y., Du, C., Song, Y., Wu, C., Hu, X., & Sun, Y. (2020). COVID-19-associated gastrointestinal and liver injury: clinical features and potential mechanisms. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00373-7>

# **ANEXOS**

**Anexo 1 – Índice de Comorbidade de Charlson**

**Anexo 1 – Índice de comorbidade de Charlson**

<b>Peso</b>	<b>Condição Clínica</b>
<b>1</b>	Infarto do miocárdio Insuficiência cardíaca congestiva Doença Vascular periférica Demência Doença cerebro-vascular Doença pulmonar crônica Doença tecido conjuntivo Diabetes leve, sem complicação Úlcera
<b>2</b>	Hemiplegia Doença renal severa ou moderada Diabetes com complicação Tumor Leucemia Linfoma
<b>3</b>	Doença do fígado severa ou moderada
<b>6</b>	Tumor maligno, metástase SIDA

## Anexo 2 – Classificação de Gravidade da Doença COVID-19

Anexo 2 – Classificação de gravidade da doença COVID-19	
<b>Doença leve</b>	Pacientes sintomáticos que atendem à definição do caso para COVID-19 sem evidência de pneumonia viral ou hipóxia.
<b>Doença moderada (Pneumonia)</b>	Adolescente ou adulto com sinais clínicos de pneumonia (febre, tosse, dispneia, respiração rápida), mas sem sinais de pneumonia grave, incluindo saturação de oxigênio (SpO <sub>2</sub> ) ≥ 90% no ar do quarto.
<b>Doença grave (Pneumonia grave)</b>	Adolescente ou adulto com sinais clínicos de pneumonia (febre, tosse, dispneia) mais um dos seguintes: taxa respiratória > 30 respirações/minuto; problema respiratório grave; ou SpO <sub>2</sub> < 90% no ar da sala.

## Anexo 3- National Early Warnig Score 2 (NEWS2)

Anexo 3 – National Early Warning Score 2 (NEWS2)							
Parâmetros Fisiológicos	Pontuação						
	3	2	1	0	1	2	3
Frequência respiratória (por minuto)	≤8		9-11	12-20		21-24	≥25
SpO2 % - Escala 1	≤91	92-93	94-95	≥96			
SpO2 % - Escala 2	≤83	84-85	86-87	88-92 ≥93 em ar ambiente	93-94 com oxigênio	95-96 com oxigênio	≥97 com oxigênio
Ar ambiente ou oxigênio?		Oxigênio		Ar Ambiente			
Pressão arterial sistólica(mmHg)	≤90	91-100	101-110	111-219			≥220
Pulso (por minuto)	≤40		41-50	51-90	91-110	111-130	≥131
Consciência				Alerta			Confusão aguda Resposta a voz ou dor Irresponsivo
Temperatura (°C)	≤35.0		35.1-36.0	36.1-38.0	38.1-39.0	≥39.1	

## Anexo 4 – SOFA – Avaliação da Insuficiência Orgânica Relacionada à Sepsé

Anexo 4 – SOFA - Avaliação Da Insuficiência Orgânica Relacionada À Sepsé				
	1	2	3	4
Respiração PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> , mmHg	< 400	< 300	< 200	< 100
			Com suporte respiratório	
Coagulação Plaquetas x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	< 150	< 100	< 50	< 20
Fígado Bilirrubina mg/dl (µmol/L)	1,2 – 1,9 (20 – 32)	2,0 – 5,9 (33 – 101)	6,0 – 11,9 (102 – 204)	> 12,0 (< 204)
Cardiovascular Hipotensão arterial	PAM < 70 mmHg	Dopamina ≥ 5 ou dobutamina (qualquer dose)*	Dopamina > 5 ou adrenalina ≥ 0,1 ou nora ≥ 0,1	Dopamina > 15 ou adrenalina > 0,1 ou nora > 0,1
Sistema nervoso central Escala de coma de Glasgow	13 – 14	10 – 12	6 – 9	< 6
Renal Creatinina, mg/dl (µmol/L) ou diurese	1,2 – 1,9 (110 – 170)	2,0 – 3,4 (171 – 299)	3,5 – 4,9 (300 – 440) ou < 500 ml/dia	> 5,0 (> 440) ou < 200 ml/dia

\*Agentes adrenérgicos administrados por, no mínimo, 1 hora (em µg/kg/min)



## Anexo 5 – Escala Clínica de Fragilidade

### Anexo 5 – Escala Clínica de Fragilidade (Versão Brasileira)

#### Escala Clínica de Fragilidade\*



**1. Muito Ativo** - Pessoas que estão robustas, ativas, com energia e motivadas. Essas pessoas normalmente se exercitam regularmente. Elas estão entre as mais ativas para a sua idade.



**2. Ativo** - Pessoas que não apresentam nenhum sintoma ativo de doença, mas estão menos ativas que as da categoria 1. Frequentemente se exercitam ou são muito ativas ocasionalmente, exemplo: em determinada época do ano.



**3. Regular** - Pessoas com problemas de saúde bem controlados, mas não se exercitam regularmente além da caminhada de rotina.



**4. Vulnerável** - Apesar de não depender dos outros para ajuda diária, frequentemente os sintomas limitam as atividades. Uma queixa comum é sentir-se mais lento e/ou mais cansado ao longo do dia.



**5. Levemente Frágil** - Estas pessoas frequentemente apresentam lentidão evidente e precisam de ajuda para atividades instrumentais de vida diária (AIVD) mais complexas (finanças, transporte, trabalho doméstico pesado, medicações). Tipicamente, a fragilidade leve progressivamente prejudica as compras e passeios desacompanhados, preparo de refeições e tarefas domésticas.



**6. Moderadamente Frágil** - Pessoas que precisam de ajuda em todas as atividades externas e na manutenção da casa. Em casa, frequentemente têm dificuldades com escadas e necessitam de ajuda no banho e podem necessitar de ajuda mínima (apoio próximo) para se vestirem.



**7. Muito Frágil** - Completamente dependentes para cuidados pessoais, por qualquer causa (física ou cognitiva). No entanto, são aparentemente estáveis e sem alto risco de morte (dentro de 6 meses).



**8. Severamente Frágil** - Completamente dependentes, aproximando-se do fim da vida. Tipicamente incapazes de se recuperarem de uma doença leve.



**9. Doente Terminal** - Aproximando-se do fim da vida. Esta categoria se aplica a pessoas com expectativa de vida < 6 meses, sem outra evidência de fragilidade.

#### Pontuando fragilidade em pessoas com demência

O grau de fragilidade corresponde ao grau de demência. Sintomas comuns na demência leve incluem esquecimento dos detalhes de um evento recente, apesar da recordação do evento em si, repetindo a mesma pergunta/história e afastamento de eventos sociais.

Na demência moderada, a memória recente está muito comprometida apesar de aparentemente lembrar bem de fatos do passado. Quando solicitadas, elas são capazes de fazer o cuidado pessoal.

Na demência severa, elas não conseguem realizar cuidados pessoais sem ajuda.

\* 1. Canadian Study on Health & Aging, Revised 2008.

2. K. Rockwood et al. A global clinical measure of fitness and frailty in elderly people. CMAJ 2005; 113:489-495.

©2009, Version 1.2\_EN; ©2018, Version 1.0\_Port. All rights reserved. Geriatric Medicine Research, Dalhousie University, Halifax, Canada. Permission granted to copy for research and educational purposes only.

# APÊNDICES

# **Apêndice 1- Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSCar**



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Análise do perfil bioquímico, inflamatório, metabólico e imunológico dos fenótipos da COVID-19

**Pesquisador:** RAFAEL LUIS LUPORINI

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 37968220.4.0000.5504

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de São Carlos/UFSCar

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.398.177

#### Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e Avaliação dos Riscos e Benefícios foram retiradas dos arquivos Informações Básicas da Pesquisa (PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1626282, de 29/10/2020), "Cronogramav3.docx" (10/11/2020), "desenhopesquisav2.pdf" de 29/10/2020 e/ou do Projeto Detalhado ( ProjetoV7HU, de 29/10/2020): RESUMO, HIPÓTESE (se houver), METODOLOGIA, CRITÉRIOS de INCLUSÃO e DE EXCLUSÃO.

Trata-se de um estudo transversal, com análise comparativa entre os 3 grupos de gravidades de pacientes com infecção pelo SARS-CoV-2, analisando história clínica, citocinas inflamatórias, metabólica (principalmente os ácidos graxos de cadeia curta). Foi retirada a análise do polimorfismo genético.

Grupos do estudo:

- 1) Grupo hospitalizado, grave: Paciente hospitalizado, com infecção por SARS-CoV-2 confirmada (RT-PCR) e que tenha necessitado de ventilação mecânica invasiva OU tenha falecido na internação;
- 2) Grupo hospitalizado, moderado: Paciente hospitalizado, com infecção por SARS-CoV-2 confirmada (RT-PCR), que não preencha os critérios acima;
- 3) Grupo não-hospitalizado, oligossintomáticos ou assintomáticos: Pacientes pouco sintomáticos, com infecção por SARS-CoV-2 confirmada por RT-PCR que procuraram os serviços de pronto

**Endereço:** WASHINGTON LUIZ KM 235

**Bairro:** JARDIM GUANABARA

**CEP:** 13.565-905

**UF:** SP

**Município:** SAO CARLOS

**Telefone:** (16)3351-9685

**E-mail:** cephumanos@ufscar.br



Continuação do Parecer: 4.398.177

atendimento do HU-UFSCar não necessitaram de internação.

Informou, no resumo, que o estudo teve o início previsto para novembro de 2020 e término em fevereiro de 2021, com a previsão de 90 voluntários, igualmente divididos nos 3 grupos. Informa que a coleta de dados dar-se-á através do preenchimento de uma ficha clínica pré-estabelecida, contendo informações sobre o quadro clínico do paciente. Também serão utilizados os prontuários dos pacientes e serão coletadas amostras de sangue para análise das citocinas inflamatórias e metabólica, no momento da confirmação diagnóstica de infecção por SARS-CoV-2. Uma nova coleta será realizada entre 60 e 90 dias do início dos sintomas, durante consulta de retorno ambulatorial. Será realizada a titulação de anticorpos através de ensaio imunoenzimático recombinante com detecção de IgG reagente contra SARSCoV-2 e avidéz dos anticorpos contra antígenos do SARS-CoV-2, tendo sido suspensa a análise do polimorfismo genético. A hipótese do presente estudo é que alguns fatores do hospedeiro, principalmente fatores gastrointestinais, estão associados a variabilidades de desfechos clínicos da infecção por SARS-CoV-2. Dentre esses fatores, temos as alterações bioquímicas (de citocinas e metabólica).

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Primário: Identificar alterações de citocinas e metabólitos associados ao eixo intestino-pulmão (entre eles IL-18 e ácidos graxos de cadeia curta – acetato, propionato e butirato) associados com pior desfecho em pacientes com infecção pelo SARS-CoV-2.

Secundário: Correlacionar os fenótipos clínicos, alterações laboratoriais (hemogramas e bioquímicos), perfil imunológico (citocinas e mediadores inflamatórios), em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2. Foi retirada a correlação com polimorfismos genéticos.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Em relação aos riscos, aponta que este estudo representa um risco mínimo para os participantes, envolvendo a coleta de uma pequena quantidade de sangue, de espirrar ou vomitar durante a coleta. Quanto aos benefícios, informa os seguintes:

- 1) O benefício direto para o participante é que a análise das citocinas inflamatórias e metabólica poderão auxiliar em decisões clínicas no tratamento ao paciente.
- 2) O principal benefício do estudo é indireto, na medida em que os dados recolhidos irão ajudar a melhorar e orientar os esforços para compreender a doença causada SARS-CoV-2, e fornecendo

**Endereço:** WASHINGTON LUIZ KM 235  
**Bairro:** JARDIM GUANABARA **CEP:** 13.565-905  
**UF:** SP **Município:** SAO CARLOS  
**Telefone:** (16)3351-9685 **E-mail:** cephumanos@ufscar.br



Continuação do Parecer: 4.398.177

valiosa contribuição para o manejo da doença, ao passo que caracteriza o perfil da população afetada.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de uma pesquisa com relevância científica e social e respeita os preceitos éticos estabelecidos pela Resolução CNS 466/2012 e suas complementares.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

**Recomendações:**

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Pendências resolvidas.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O parecer do relator foi apreciado por uma câmara técnica virtual do CEP, atendendo às recomendações da Conep para análises de protocolos de pesquisa relativos à Covid-19. Diante do exposto, o Comitê de ética em pesquisa - CEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 510 de 2016, manifesta-se por considerar "Aprovado" o projeto. Conforme dispõe o Capítulo VI, Artigo 28, da Resolução Nº 510 de 07 de abril de 2016, a responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais, cabendo-lhe, após aprovação deste Comitê de Ética em Pesquisa: II - conduzir o processo de Consentimento e de Assentimento Livre e Esclarecido; III - apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; IV - manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período mínimo de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa; V - apresentar no relatório final que o projeto foi desenvolvido conforme delineado, justificando, quando ocorridas, a sua mudança ou interrupção. Este relatório final deverá ser protocolado via notificação na Plataforma Brasil. OBSERVAÇÃO: Nos documentos encaminhados por Notificação NÃO DEVE constar alteração no conteúdo do projeto. Caso o projeto tenha sofrido alterações, o pesquisador deverá submeter uma "EMENDA".

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P	10/11/2020		Aceito

**Endereço:** WASHINGTON LUIZ KM 235

**Bairro:** JARDIM GUANABARA

**CEP:** 13.565-905

**UF:** SP

**Município:** SAO CARLOS

**Telefone:** (16)3351-9685

**E-mail:** cephumanos@ufscar.br





Continuação do Parecer: 4.398.177

Básicas do Projeto	ETO_1626282.pdf	14:29:34		Aceito
Parecer Anterior	Carta_Resposta_versao2.docx	10/11/2020 14:29:03	RAFAEL LUIS LUPORINI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEV3.docx	10/11/2020 14:27:44	RAFAEL LUIS LUPORINI	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	OficioSEI.pdf	29/10/2020 18:27:34	RAFAEL LUIS LUPORINI	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_compromisso_HU.pdf	29/10/2020 18:27:20	RAFAEL LUIS LUPORINI	Aceito
Folha de Rosto	folhaRosto.pdf	29/10/2020 18:23:29	RAFAEL LUIS LUPORINI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetov9HU.docx	29/10/2020 00:40:13	RAFAEL LUIS LUPORINI	Aceito
Parecer Anterior	Carta_Resposta_versao1.docx	29/10/2020 00:38:27	RAFAEL LUIS LUPORINI	Aceito
Outros	desenhopesquisaV2.pdf	29/10/2020 00:36:35	RAFAEL LUIS LUPORINI	Aceito
Cronograma	CronogramaV3.docx	29/10/2020 00:36:02	RAFAEL LUIS LUPORINI	Aceito
Outros	FICHACLINICA.docx	13/09/2020 11:56:04	RAFAEL LUIS LUPORINI	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO CARLOS, 13 de Novembro de 2020

Assinado por:  
**ADRIANA SANCHES GARCIA DE ARAUJO**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** WASHINGTON LUIZ KM 235

**Bairro:** JARDIM GUANABARA

**UF:** SP

**Município:** SAO CARLOS

**CEP:** 13.565-905

**Telefone:** (16)3351-9685

**E-mail:** cephumanos@ufscar.br

# **Apêndice 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido**



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



(Resolução 466/2012 do CNS)

1. **Título da pesquisa:** Análise do perfil bioquímico, inflamatório e metabólico dos fenótipos do COVID-19
2. **Nome do investigador principal:** Prof. Rafael Luís Luporini
3. **Instituições:** Universidade Federal de São Carlos / Hospital Universitário da UFSCar
4. **Natureza da pesquisa:** Estamos convidando você para participar da pesquisa intitulada: “Análise do perfil bioquímico, inflamatório e metabólico dos fenótipos do COVID-19” que tem como finalidade conhecer melhor a infecção causada pelo coronavírus, o porque ele afeta de maneiras diferentes as pessoas, com sintomas variando desde pessoas assintomáticas, até casos graves, com progressão para necessidade de assistência respiratória e até mesmo óbito.
5. Estamos passando por epidemia decorrente a infecção causada por um coronavírus chamado de SARS-CoV-2, responsável por uma doença conhecida como COVID-19. Essa doença pode causar diversos problemas de saúde, entre eles, sintomas respiratórios, como falta de ar, dificuldade para respirar, sintomas digestivos, como diarreia, dor abdominal, náusea, vômito e perda do apetite, além de diversos outros sintomas.
6. É necessário conhecer melhor esse vírus que tem afetado um número crescente de pessoas no Brasil, incluindo a cidade de São Carlos. É preciso entender por que a doença apresenta progressão pior em algumas pessoas, enquanto pode evoluir de forma sem sintomas em outras.
7. **Objetivo:** O objetivo do presente estudo é:
  - a. Avaliar as alterações das citocinas inflamatórias encontradas em pacientes com quadro grave em comparação a quadros moderados e leves.
  - b. Avaliar as alterações de proteínas e lipídios (metabólica) dos pacientes com quadro grave em comparação a quadros moderados e leves.
  - c. Analisar as alterações bioquímicas dos pacientes com quadro grave em comparação a quadros moderados e leves.
  - d. Analisar a quantidade e qualidade de anticorpos contra o SARS-CoV-2 60 a 90 dias após o início dos sintomas.
8. Estamos convidando você a participar do estudo porque recebeu o diagnóstico positivo para infecção pelo coronavírus (SARS-CoV-2) durante o atendimento no Hospital Universitário da UFSCar.
9. **Explicação dos métodos do estudo:** A sua participação na pesquisa, caso você concorde e dê o seu consentimento em participar da pesquisa, consistirá em:
  - a. História médica de seus sintomas, histórico pessoal e exame físico detalhados que serão extraídos de seu prontuário
  - b. A confirmação do resultado de positividade do SARS-CoV-2 através de exame prévio.
  - c. Coleta de 20 ml de sangue para análise de diversas substâncias, entre elas proteínas, gorduras e mediadores de inflamação genética no dia do diagnóstico e nova coleta após 60 a 90 dias do início dos sintomas.
  - d. A coleta de sangue será realizada no dia em que receber o diagnóstico, em internação hospitalar ou consulta ambulatorial de retorno.
  - e. Todas as coletas serão realizadas pelos pesquisadores ou por equipe de saúde capacitada. Será garantida assistência a toda e qualquer doença diagnosticada durante a pesquisa.
  - f. O material de sangue será analisado pelo Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas (LIDI) do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da UFSCar se autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). As amostras serão utilizadas para atender aos objetivos desta pesquisa dado que o conhecimento sobre o funcionamento de indicadores de doenças relacionadas à COVID-19 poderá auxiliar no entendimento sobre as possíveis causas e na melhoria das formas de diagnóstico e tratamento desta condição (como por exemplo desenvolvimento de painel diagnóstico e vacina). Após as análises, as amostras serão descartadas.
10. **Riscos e Desconfortos:** A coleta de exame de sangue pode doer, levar a hematoma e inflamação do vaso sanguíneo manipulado ou mesmo infecção.
11. **Benefícios:** Não haverá benefício direto para os participantes da pesquisa. Você receberá o mesmo tratamento que seria indicado em caso de não participação do protocolo de pesquisa. Você colaborará para que se possa descobrir mais sobre a doença e levantar hipóteses que possam levar a prevenção ou tratamento da doença.
12. Está garantida a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de dúvidas acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados a pesquisa. Contactar o pesquisador responsável: Prof. Rafael Luís Luporini, (16) 991549388.

13. Você poderá ter acesso aos resultados dos exames realizados durante o estudo.
14. **Liberdade em participar ou não do estudo:** É sua escolha participar ou não desse estudo. Você não é obrigado a juntar-se a esse estudo. Você pode se recusar a participar ou mesmo desistir da pesquisa a qualquer hora, retirando seu consentimento, sem nenhuma penalização ou prejuízo ao seu tratamento atual ou futuro. Você terá a liberdade de retirar o consentimento de uso e guarda do material biológico. Você poderá solicitar a retirada dos seus dados genéticos de bancos onde estejam armazenados.
15. **Confidencialidade:** Todos os participantes da pesquisa terão sigilo garantido em relação aos seus nomes e outras informações pessoais. Apenas os pesquisadores saberão a identidade de cada participante e seus dados para contato. Sua amostra de DNA será codificada de maneira a não permitir que ninguém, exceto as pessoas que trabalham diretamente neste estudo, conectem seu código de amostra a suas informações pessoais, como seu nome e endereço. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar a sua identificação.
16. **Considerações éticas adicionais:** Não haverá pagamento para a participação na pesquisa. Está prevista a assistência e indenização a qualquer eventual dano decorrente da pesquisa de acordo com a resolução do CNS nº 466/2012. Qualquer desconforto ou problema decorrente da participação da pesquisa pode e deve ser relatado ao pesquisador: Rafael Luís Luporini nos telefones do item 12.
17. Você receberá uma via desse termo, rubricada em todas as suas páginas, onde consta o telefone e endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.
18. Declaro que entendi os objetivos, os riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar. O pesquisador informou que o projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa em seres humanos do Hospital Universitário da UFSCar. Declaro também que concordo com a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do material biológico humano (sangue) para investigações pertinentes com os objetivos desta pesquisa. Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP) EM SERES HUMANOS DA UFSCAR:** Sua função é fiscalizar, educar, ensinar preceitos éticos relacionados à pesquisa envolvendo seres humanos, normalmente localizado onde as pesquisas se localizam, e vinculado à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e Conselho Nacional de Saúde (CNS) do Ministério da Saúde (MS). (Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos)

Endereço: Rodovia Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676 - CEP 13.565-905 - São Carlos - SP - Brasil. Telefone (16) 33519685. Endereço eletrônico: cephumanos@power.ufscar.br. Horário de funcionamento: 9:00 as 18:00 horas.

**COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA (CONEP)**

É uma comissão do Conselho Nacional de Saúde – CNS, que tem a função de implementar as normas e diretrizes regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, aprovadas pelo Conselho, também atuando conjuntamente com uma rede de Comitês de Ética em Pesquisa - CEP- organizados nas instituições onde as pesquisas se realizam. Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP SRTV 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar – Asa Norte CEP: 70719-040, Brasília/DF

Desta forma, o CONEP e o CEP da UFSCar tem a função neste projeto em educar, orientar e aprovar as questões éticas envolvidas, assim como fiscaliza-las para garantir o cumprimento das normas por eles estabelecidos.

“Sim, eu aceito participar da pesquisa e aceito que os pesquisadores acessem meu prontuário médico para ter acesso as informações necessárias.

“Não” - seu me recuso a participar do estudo.

**Endereço para contato (24 horas por dia e sete dias por semana):**

Pesquisador Responsável: Rafael Luís Luporini

Endereço: Hospital Universitário Prof. Dr. Horácio Carlos Panepucci; R. Luís Vaz de Camões, 111 - Vila Celina, São Carlos - SP, 13566-448

Contato telefônico: (16) 991549388 E-mail: [rafaelluporini@ufscar.br](mailto:rafaelluporini@ufscar.br)

Local e data: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Nome do Pesquisador

\_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador

# **Apêndice 3 - Protocolo de extração de dados**

## ESTUDO TRANSVERSAL COVID-19

### Protocolo de Extração de Dados Clínicos (avaliados na data da internação)

<b>Registro:</b>	<b>Data de nascimento:</b>	<b>Gênero (M/F):</b>
<b>Raça:</b> <input type="checkbox"/> Branca <input type="checkbox"/> Negra / Parda <input type="checkbox"/> Outra		
<b>Data início sintomas:</b> _____ <b>Data de início da dispneia:</b> _____ <b>Data da admissão hospitalar:</b> _____ <b>Data de admissão na UTI:</b> _____ <input type="checkbox"/> Sem admissão na UTI		<b>Data da alta hospitalar:</b> _____ <input type="checkbox"/> Óbito <input type="checkbox"/> Alta <input type="checkbox"/> Transferência
<b>Comorbidades:</b> <input type="checkbox"/> Hipertensão <input type="checkbox"/> Doença cardiovascular <input type="checkbox"/> Doença cerebrovascular <input type="checkbox"/> Diabetes <input type="checkbox"/> Câncer <input type="checkbox"/> Pneumopatia <input type="checkbox"/> Obesidade <input type="checkbox"/> Doença renal crônica <input type="checkbox"/> Doença hepática crônica <input type="checkbox"/> HIV <input type="checkbox"/> Tabagismo <input type="checkbox"/> Outra: _____		<b>Sinais e sintomas:</b> <input type="checkbox"/> Febre <input type="checkbox"/> Fadiga <input type="checkbox"/> Tosse <input type="checkbox"/> Anorexia <input type="checkbox"/> Mialgia <input type="checkbox"/> Artralgia <input type="checkbox"/> Dispneia <input type="checkbox"/> Expectoração <input type="checkbox"/> Faringalgia <input type="checkbox"/> Náusea <input type="checkbox"/> Tontura <input type="checkbox"/> Coriza <input type="checkbox"/> Diarreia <input type="checkbox"/> Cefaleia <input type="checkbox"/> Vômitos <input type="checkbox"/> Dor abdominal <input type="checkbox"/> Congestão conjuntival <input type="checkbox"/> Hemoptise <input type="checkbox"/> Anosmia/ageusia <input type="checkbox"/> Espirros <input type="checkbox"/> Outro: _____
<b>Dados Vitais (primeira aferição do dia):</b> <b>FC:</b> _____ <b>FR:</b> _____ <b>SpO2:</b> _____ <b>PAM:</b> _____ <b>Glasgow:</b> _____ <b>T:</b> _____		<b>Oferta de oxigênio:</b> <input type="checkbox"/> Sem necessidade de O2 <input type="checkbox"/> Cânula nasal <input type="checkbox"/> Máscara facial <input type="checkbox"/> Ventilação não invasiva <input type="checkbox"/> Ventilação mecânica invasiva
<b>Terapêutica durante a internação:</b> Antibiótico: S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> Qual(is): _____ Antiviral: S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> Qual(is): _____		Corticoide: S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> Qual(is): _____ Heparina: S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> Qual(is): _____

