

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO
PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA E CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE

**ALTERAÇÃO DO SISTEMA IMUNE INATO EM
PACIENTES OBESOS COM COVID-19:
IMPLICAÇÃO DO EIXO HIF-NLRP3-
GASDERMINA D NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA
PULMONAR**

Aluna: Raíssa Campos D'Amico
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cristina Pelegrino Baena
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Lucia de Noronha

Curitiba, março de 2023

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO
PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA E CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE

**ALTERAÇÃO DO SISTEMA IMUNE INATO EM
PACIENTES OBESOS COM COVID-19:
IMPLICAÇÃO DO EIXO HIF-NLRP3-
GASDERMINA D NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA
PULMONAR**

Dissertação de mestrado acadêmico apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde como
requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da
Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cristina Pelegriño Baena

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Lucia de Noronha

Curitiba, março de 2023

Dedico esse trabalho à todas as vítimas da pandemia de COVID-19 e suas famílias, cujo sofrimento foi inenarrável, porém, permitiram que tal sentimento fosse transformado em ciência.

AGRADECIMENTOS

Esse mestrado é, primeiramente, fruto do prêmio Marcelino Champagnat conquistado em 2016 após minha graduação em medicina, portanto, encaro como um presente dado pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná e recebido, por mim, com muita gratidão.

Em segundo lugar, agradeço imensamente a minha orientadora, Prof.^a. Dr.^a Cristina Baena, por ter aceitado, logo em 2016, esse novo desafio ao meu lado; não sabíamos, naquele momento, sobre o que seria, como seria, mas havia a certeza que caminharíamos juntas nessa jornada. Obrigada pelo seu exemplo, apoio e cuidado.

Agradeço a toda a equipe do laboratório de Patologia Experimental da Escola de Medicina da PUC-PR, especialmente a Dr.^a Lucia de Noronha e Dr. Seigo Nagashima, cuja dedicação e esforço não podem ser esquecidos. Obrigada também aos acadêmicos de medicina da PUC-PR e UFPR que auxiliaram na confecção desse trabalho, especialmente na coleta de dados, realização da seleção de lâminas e desenvolvimento da análise estatística. Entre todos, imensa gratidão ao Lucas Baena, incansável e dedicado a esse mestrado, quase como se fosse dele.

Por fim, agradeço a minha família e noivo, que sempre me apoiam e ficam ao meu lado, independentemente das minhas escolhas e decisões.

“Nada se compara a ser a primeira pessoa da história do mundo a compreender algo.”

Cecilia Payne-Gaposchkin

Essa dissertação de mestrado foi elaborada utilizando o modelo Vancouver. Esse trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Patologia Experimental, da Escola de Medicina e Ciências da Vida e do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR. Declaramos que não há conflito de interesse na realização da presente Tese.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ASC Proteína adaptadora do domínio CARD associada a apoptose, do inglês, *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*

ATP Adenosina trifosfato

CASP-1 Caspase-1

COVID-19 Doença do coronavírus 2019, do inglês, *coronavirus disease 2019*

DAMPs Padrões moleculares associados a danos, do inglês, *damage-associated molecular patterns*

ECA 2 Enzima conversora de angiotensina 2, do inglês, *angiotensin converting enzyme 2*

EROS Espécies reativas de oxigênio, do inglês, *reactive oxygen species*

GASD-D Gasdermina- D

H&E Hematoxilina-eosina

HIF 1- α Fator induzível por hipóxia 1-alfa, do inglês, *hypoxia-inducible factor 1-alpha*

IL-1 β Interleucina 1- beta

IL-18 Interleucina 18

IL-6 Interleucina-6

IL-8 Interleucina-8

IMC Índice de Massa Corpórea

LDH Lactato desidrogenase

NF- κ B Fator nuclear kappa-B, do inglês, *nuclear factor kappa-B*

NLRP3 do inglês, *NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3*

NO Óxido nítrico, do inglês, *nitric oxide*

OMS Organização Mundial da Saúde

P2X7 Receptor purinérgico P2X7

PAMPs padrões moleculares associados a patógenos, do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*

RNA Ácido ribonucleico, do inglês, *ribonucleic acid*

RT-PCR Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase, do inglês, *reverse transcription polymerase chain reaction*

SARA Síndrome da angústia respiratória aguda

SARS-CoV-2 Coronavírus da síndrome respiratória aguda 2, do inglês, *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*

TCLE termo de consentimento livre e esclarecido

TLR Receptores tipo-Toll, do inglês, *Toll-like receptor*

TMA Blocos multiamostrais, do inglês, *tissue microarray*

TNF- α Fator de necrose tumoral alfa, do inglês, *tumoral necrosis-factor alpha*

UTI Unidade de Terapia Intensiva

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos fisiopatológicos que poderiam justificar a maior gravidade da COVID-19 no paciente obeso.....	8
Figura 2: Esquema ilustrativo representando a via de ativação do inflamassoma resultando em morte celular por piroptose.....	14
Figura 3: Esquema ilustrativo da metodologia desenvolvida.....	22
Figura 4: Composição demonstrando os processos da segmentação semiautomatizada por cores.....	24

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Especificações acerca dos anticorpos que foram usados para a técnica de imunohistoquímica	22
Quadro 2: Dados Clínicos do Grupo A.....	26
Quadro 3: Dados Clínicos do Grupo B	32

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Análise Estatística de Imunoexpressão da IL-6	35
Gráfico 2: Análise Estatística de Imunoexpressão da IL-8	35
Gráfico 3: Análise Estatística de Imunoexpressão do TNF- α	36
Gráfico 4: Análise Estatística de Imunoexpressão do NALP	36
Gráfico 5: Análise Estatística de Imunoexpressão da IL-18	37
Gráfico 6: Análise Estatística de Imunoexpressão da IL-1 β	37
Gráfico 7: Análise Estatística de Imunoexpressão da GASD-D	38
Gráfico 8: Análise Estatística de Imunoexpressão do HIF	38

RESUMO

Introdução: Desde o início da pandemia de COVID-19, a obesidade tem sido citada como um dos principais fatores para uma evolução desfavorável da doença; entre várias hipóteses, acredita-se que a ativação da via do inflamassoma NLRP3 pode ser um dos mecanismos responsáveis por esse aumento de risco, já que essa via inflamatória se encontra ativada tanto em indivíduos obesos quanto em pacientes com COVID-19. Entretanto, a exata relação entre essas duas doenças e a via do inflamassoma ainda carece de esclarecimentos na literatura.

Objetivo: Identificar a ativação da via inflamatória do inflamassoma em pacientes obesos que vieram a óbito por COVID-19. **Metodologia:** Foram analisadas biópsias pulmonares *post-mortem* de participantes obesos que vieram a óbito por COVID-19 no Hospital Marcelino Champagnat. As amostras foram comparadas com o grupo controle, composto a partir de amostras pulmonares oriundas do Hospital das Clínicas de Curitiba, obtidas de participantes obesos que vieram a óbito por outras causas. As amostras foram submetidas a análise histológica e imunohistoquímica para avaliar os marcadores IL-6, TNF- α , IL-8, IL-1 β , IL-18, NALP 3, gasdermina-D e HIF. **Resultados:** Foram encontrados aumentos estatisticamente significativos relacionados aos imunomarcadores IL-6 ($p < 0,0001$), IL-18 ($p = 0,002$), NALP 3 ($p = 0,0004$) e HIF ($p = 0,0327$) nos pacientes obesos sem COVID-19 (grupo controle), quando comparados aos pacientes obesos que vieram a óbito por COVID-19. **Conclusão:** O processo inflamatório induzido pelo inflamassoma NLRP3 no paciente obeso com COVID-19 não difere daquele causado por outras doenças graves nos pacientes obesos.

PALAVRAS-CHAVE: COVID-19, SARS-CoV-2, inflamassoma, piroptose, obesidade.

ABSTRACT

Introduction: Since the beginning of the COVID-19 pandemic, obesity has been quoted as one of the main risk factors for an unfavorable evolution of the disease; among several hypotheses, it is believed that the activation of the NLRP3 inflammasome pathway may be one of the mechanisms responsible for this increased risk, since this inflammatory pathway is activated both in obese individuals and in patients with COVID-19. However, the exact relationship between these two diseases and the inflammasome pathway still lacks clarification in the literature. **Objective:** To identify the activation of the inflammasome pathway in obese patients who died from COVID-19. **Methodology:** *Post-mortem* lung biopsies were performed on obese patients who have died from COVID-19 at Hospital Marcelino Champagnat. These samples were compared to control group, created from lung samples obtained from obese patients who died from other causes than COVID-19, obtained from the Hospital das Clínicas de Curitiba. All samples were submitted to histological and immunohistochemical evaluation to identify the markers IL-6, TNF- α , IL-8, IL-1 β , IL-18, NALP, gasdermin-D and HIF. **Results:** Statistically significant increases related to the immunomarkers IL-6 ($p < 0.0001$), IL-18 ($p = 0.002$), NALP ($p = 0.0004$) and HIF ($p = 0.0327$) were found in obese patients without COVID-19 (control group), when compared to obese patients who died from COVID-19. **Conclusion:** The inflammatory process induced by the NLRP3 inflammasome in obese patients with COVID-19 does not differ from that caused by other serious diseases in obese patients.

KEY-WORDS: COVID-19, SARS-CoV-2, inflammasomes, pyroptosis, obesity.

RESUMO POPULAR

A COVID-19 é uma doença viral causada pelo vírus conhecido como SARS-CoV-2 e pode se manifestar com uma ampla variedade de sintomas, desde tosse e coriza nasal até graves pneumonias que podem levar a morte. Os indivíduos obesos têm sido considerados como um grupo de risco para evoluir com as formas mais graves dessa doença infecciosa, mas os mecanismos que causam essa associação seguem sem explicação clara pela ciência até hoje. A resposta imunológica dos pacientes com obesidade, mediada pelo sistema imunológico, responsável por defender nosso organismo de infecções, parece ser diferenciada nesses pacientes quando comparamos com indivíduos não obesos: há uma inflamação crônica ativa no paciente com obesidade, condição que muitos cientistas acreditam que poderia justificar essa maior gravidade que observamos no paciente obeso com COVID-19. No paciente obeso, parece ocorrer uma pré-ativação de uma via inflamatória específica conhecida como via do inflamassoma NLRP3. Na COVID-19, essa mesma via parece ser profundamente ativada e é capaz de induzir um tipo de morte celular muito particular, chamado de piroptose, caracterizado por uma perda da integridade do envoltório celular chamado de membrana plasmática. Para entender melhor a relação entre obesidade, COVID-19 e a via inflamatória do inflamassoma, nesse estudo, comparamos biópsias pulmonares de pacientes com obesidade que morreram por COVID-19 com biópsias de pulmão de pacientes obesos que morreram por outras doenças e comparamos a ativação do sistema imunológico, mais especificamente da via do inflamassoma NLRP3, nessas duas situações. Pudemos observar que, na verdade, ao contrário do que era imaginado, a COVID-19 promove um grau de inflamação similar a várias outras doenças graves nesse grupo de pacientes e que a “tempestade de citocinas” que ocorre no paciente com obesidade e COVID-19 ocorre em um grau similar, até mesmo superior, em várias outras doenças que acometem pacientes obesos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A INFLAMAÇÃO CRÔNICA NA OBESIDADE	2
1.2. A OBESIDADE NA COVID-19	5
1.3. A AÇÃO DO SARS-COV-2 NAS CÉLULAS PULMONARES	9
1.4. O INFLAMASSOMA NLRP3 E SUA RELAÇÃO TANTO COM A OBESIDADE QUANTO COM A COVID-19	10
1.5. HIF-1 α COMO MODULADOR DA ATIVAÇÃO DA VIA DO INFLAMASSOMA NLRP3	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. OBJETIVO GERAL	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	18
3.2. COLETA DE DADOS CLÍNICOS	19
3.3. COLETA DAS AMOSTRAS DE TECIDO PULMONAR	20
3.4. COLETA DE DADOS DO GRUPO CONTROLE	20
3.5. ANÁLISE HISTOLÓGICA	21
3.6. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA	21
3.7. DIGITALIZAÇÃO E ANÁLISE DAS IMAGENS	23
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
3.9. NOMENCLATURA DOS GRUPOS	25
4. RESULTADOS	25
4.1. DADOS CLÍNICOS	25
4.2. DADOS ESTATÍSTICOS	33
5. DISCUSSÃO	39
6. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	49
7. CONCLUSÃO E ETAPAS FUTURAS	49
8. REFERÊNCIAS	51
9. ANEXOS	61
9.1. ANEXO 1: PARECER DA COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA	61
9.2. ANEXO 2: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	62

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define sobrepeso e obesidade como o acúmulo anormal de gordura corporal que pode trazer danos para a saúde, sendo um indivíduo classificado como obeso quando apresenta índice de massa corpórea (IMC) igual ou superior a 30 kg/m^2 . (1) Estatísticas recentes demonstram que quase dois bilhões de pessoas ao redor do mundo apresentam algum grau de sobrepeso ou obesidade, o que representa, aproximadamente, 30% da população mundial. (2)

Desde 1998, a obesidade é considerada como um problema de saúde pública emergente, sendo abordada, desde então, pela OMS, como uma epidemia. (2) Nesse período, os países desenvolvidos eram os mais associados com o aumento notável da prevalência de obesidade mundial, entretanto, nos últimos anos, tem-se percebido que a velocidade de crescimento do número de obesos está entrando em estabilidade nesses países, porém tem apresentado uma importante elevação nos países em desenvolvimento, como o Brasil. (1,3) As estatísticas também demonstram que quase todos os países do mundo apresentam uma prevalência de sobrepeso e obesidade populacional superior a 20% e que nenhum país tem apresentado redução dessa prevalência ao longo dos anos. (4)

A obesidade está associada a uma série de comorbidades, entre elas, as doenças cardiovasculares, como a doença arterial coronariana e insuficiência cardíaca, e outras como a diabetes tipo 2, hipertensão e dislipidemia, sendo estimado que aproximadamente quatro milhões de mortes ao redor do mundo, por ano, sejam associadas ao excesso de peso. (5,6)

1.1. A INFLAMAÇÃO CRÔNICA NA OBESIDADE

O tecido adiposo é extremamente ativo e participa de vários processos, incluindo proliferação e diferenciação celular, controle, juntamente com o sistema endócrino, do metabolismo da glicose e dos lipídeos, tendo também ação regulatória sobre o sistema imunológico. Quando há o estabelecimento de um quadro de obesidade ocorre aumento do volume dos adipócitos, resultando em um desbalanço na fisiologia do tecido adiposo. A hipertrofia e a hiperplasia do tecido adiposo são gatilhos para o desencadeamento de um processo inflamatório basal crônico, cuja existência tem sido cada vez mais reconhecida e estudada no obeso. (1,3,4)

O aumento do volume dos adipócitos promove duas principais alterações: a primeira delas é a isquemia crônica do tecido adiposo devido a uma desproporção célula-vaso: o aumento do tecido adiposo em volume não é acompanhado pelo aumento da vascularização celular. A isquemia promove o acúmulo do fator induzível pela hipóxia 1-alfa (HIF 1- α), causador de inflamação e indutor de fibrose tecidual. (7)

A segunda alteração associada a hipertrofia e hiperplasia das células adiposas é o desequilíbrio na secreção das duas principais moléculas liberadas pelo tecido gorduroso, a leptina e a adiponectina. (3,6) A leptina age primariamente no hipotálamo para controlar a saciedade e o metabolismo energético, enquanto a adiponectina age na redução da massa corpórea gordurosa e aumenta a sensibilidade tecidual a insulina. Na obesidade, há uma produção e liberação elevadas de leptina e reduzidas de adiponectina; esse

desequilíbrio auxilia na iniciação do estado pró-inflamatório característico do paciente obeso. (3,6)

O tecido adiposo trabalha, portanto, como uma glândula endócrina secretando mediadores e citocinas pró-inflamatórias com ação local e em longas distâncias. Há receptores de leptina, por exemplo, nas células do parênquima pulmonar; dada sua ação pró-inflamatória quando em altas concentrações, como na obesidade, a leptina pode contribuir para o estabelecimento de um quadro inflamatório basal e crônico respiratório. (8) Há citada, na literatura, uma possível relação entre a inflamação basal existente na obesidade e o desenvolvimento de algumas doenças pulmonares, como por exemplo a asma e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). (9,10)

Tal estado pró-inflamatório crônico é representado pela elevação da concentração de citocinas inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6), a interleucina-8 (IL-8) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e aumento no recrutamento de macrófagos, que são responsáveis por promover um feedback positivo na secreção de citocinas pró-inflamatórias. (1,3,6,11)

Em longo prazo, o estado crônico pró-inflamatório sistêmico do obeso resulta em disfunção endotelial, que é uma condição caracterizada pela perda da função de homeostasia do endotélio vascular. O endotélio consiste na camada mais interna de células que compõem os vasos, tendo papel fundamental na regulação da fisiologia corporal, sendo o responsável pelo desenvolvimento de várias funções, entre elas o ajuste fino do fluxo sanguíneo, distribuição de micronutrientes para as células, controle da

migração e proliferação celular, controle dos mecanismos de coagulação e fibrinólise, modulação inflamatória e indução da angiogênese. (1,3,12)

Sob condições fisiológicas, o funcionamento do endotélio é mantido por um fino equilíbrio entre as secreções de agentes vasodilatadores, entre eles o óxido nítrico (NO) e as prostaciclinas, e agentes vasoconstritores, como a angiotensina II e as prostaglandinas. Mudanças nesse balanço predis põem o endotélio a um estado pró-trombótico e pró-aterogênico, resultando em uma inflamação caracterizada pelo aumento da aderência e migração leucocitária, pela ativação e adesão plaquetária e pela indução de processos celulares geradores de metabólitos oxidativos como as espécies reativas de oxigênio (EROS). Em última instância, a disfunção endotelial acaba sendo a fisiopatologia de base para todas as doenças cardiovasculares associadas a obesidade, já que no obeso esse delicado equilíbrio é perdido e a disfunção endotelial com inflamação crônica torna-se uma constante. (1,3,6)

A hipertrofia e a hiperplasia das células adiposas não são os únicos mecanismos indutores de inflamação e disfunção endotelial na obesidade. A obesidade é associada a altas concentrações séricas de ácidos graxos livres. Isso representa um desafio para as células endoteliais, já que o mecanismo de geração de energia na forma de adenosina-trifosfato (ATP) a partir dos ácidos graxos envolve a produção e liberação de EROS, cuja ação é deletéria para o endotélio. (5) As EROS estão associadas a uma redução da biodisponibilidade de óxido nítrico no endotélio, auxiliando, portanto, na indução de disfunção endotelial. (1) Além do mais, as citocinas pró-inflamatórias secretadas no paciente obeso, principalmente a IL-6 e o TNF- α estão associadas a uma

indução de vias celulares de oxidação, aumentando a formação de espécies reativas de oxigênio. (1,5,6)

Sendo assim, o efeito somado de todas essas condições presentes no obeso é de um estado inflamatório crônico e hipercitocinemia, culminando em uma imunidade inata ineficaz e um ambiente propício para a ocorrência de estados inflamatórios exacerbados, caracterizados principalmente pela ocorrência de grave disfunção endotelial. (11)

1.2. A OBESIDADE NA COVID-19

Desde dezembro de 2019, o mundo inteiro tem acompanhado o surgimento e a instalação de uma nova doença de cunho respiratório, a COVID-19 causada pelo vírus SARS-CoV-2. (4)

Conforme a doença foi se alastrando e foi decretada como pandemia em março de 2020 pela OMS, múltiplas descobertas foram feitas com relação a sua fisiopatologia, evolução, prognóstico e fatores de risco. A obesidade tem sido citada, desde o começo da pandemia, como um dos principais fatores de risco para evolução desfavorável da doença. (4,13) Tal associação não é novidade, já que a obesidade foi relacionada a piores prognósticos em outras infecções virais, como na pandemia de Influenza A subtipo H1N1 em 2009, sendo demonstrado em artigos que os pacientes obesos apresentaram maior necessidade de hospitalização, internamento em UTI e ventilação mecânica. (11,14,15)

Vários estudos reportaram a associação entre obesidade e maior gravidade da COVID-19. Gao *et cols.* identificaram uma associação linear positiva e significativa entre o aumento do IMC e a admissão em leitos de

unidade de terapia intensiva, com crescimento significativo do risco para cada unidade de IMC aumentada. O risco de morte também apresentou uma elevação linear para indivíduos com IMC maior do que 28 kg/m². (13) Um estudo de coorte observacional prospectivo identificou achados semelhantes: pacientes com IMC elevado (≥ 30 kg/m²) apresentaram maior admissão em leitos de UTI; além do mais, entre os pacientes que foram a óbito por COVID-19, foi observado que os pacientes obesos eram significativamente mais jovens do que os não obesos. (16) Popkin *et al* desenvolveram uma metanálise que demonstrou que indivíduos com obesidade apresentaram maior risco de serem diagnosticados com COVID-19, além de apresentarem maiores chances de hospitalização, internamento em UTI e também maior necessidade de ventilação mecânica. (4) Outras metanálises chegaram a mesma conclusão, considerando a obesidade como um fator de risco independente para gravidade na COVID-19. (17,18) Amostra de pacientes de Curitiba demonstrou que pacientes obesos necessitaram de mais cuidados intensivos e que 75% dos pacientes incluídos no estudo e que necessitaram de hospitalização em UTI eram, de fato, obesos. (19)

Os mecanismos fisiopatológicos que poderiam justificar essa associação ainda estão em estudo e muitas hipóteses já foram levantadas. Sabe-se, por exemplo, que o vírus SARS-CoV-2 penetra nas células humanas através da ligação direta com o receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2), localizado nas superfícies celulares; é sabido que pacientes obesos apresentam maior expressão desse receptor no tecido adiposo, de forma que essa disponibilidade aumentada favoreceria a penetração celular do vírus. Além do mais, esse fato parece ser indicativo que

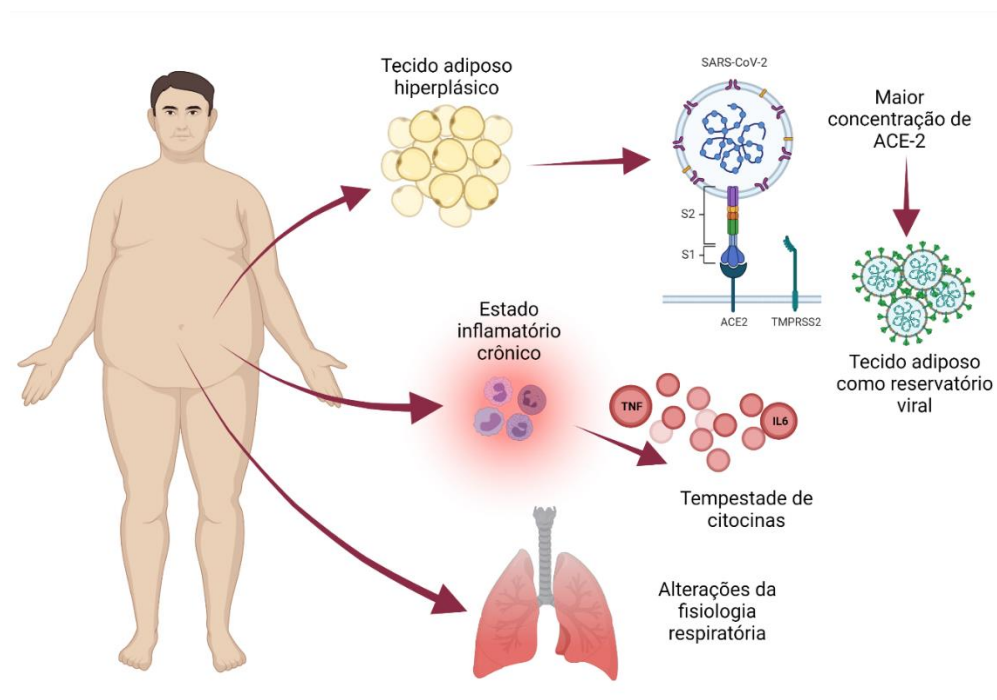
o tecido adiposo se comporta como um reservatório viral, aumentando e prolongando a carga viral nos pacientes obesos (Figura 1). (4,7,12,18)

Além disso, vários estudos já vêm demonstrando que a obesidade, por ser um estado crônico inflamatório com desregulação hormonal e imunológica, pode comprometer a resposta inata do sistema imune a infecções em geral, sendo a COVID-19 uma delas. (1,4) Na vigência de um estado pró-inflamatório, como ocorre no obeso, a infecção viral desencadeia uma resposta imunológica falha, caracterizada por uma secreção exacerbada de citocinas e uma ação ineficiente de linfócitos T e B, que resulta em um quadro de hiperpermeabilidade vascular, hipercoagulabilidade e disfunção endotelial generalizada, induzindo a falência múltipla dos órgãos e, posteriormente, morte. (4,11,18)

O mesmo estudo de coorte previamente citado identificou uma correlação positiva entre a dosagem de marcadores associados a disfunção endotelial (E-selectina, P-selectina, angiopoetina 2 e fator de crescimento placentário) e $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$; sendo assim, o artigo sugere que pacientes obesos são mais suscetíveis a infecção grave pelo SARS-CoV-2 devido a disfunção endotelial de base, causada pela liberação exacerbada de espécies reativas de oxigênio, inflamação crônica e desregulação metabólica associada ao tecido adiposo perivascular aumentado; o mesmo estudo também avaliou pacientes com IMC considerado normal ($< 25 \text{ kg/m}^2$) e mesmo em pacientes não-obesos com estado de hiperinflamação (concentração elevada de citocinas plasmáticas), não foram identificados marcadores elevados para disfunção endotelial. (16)

A própria anatomia do paciente obeso parece estar diretamente associada ao maior risco de evolução desfavorável da COVID-19 nessa população. (4) Pacientes obesos apresentam importantes alterações na fisiologia respiratória, com tendência a apresentar volume expiratório reduzido, capacidade funcional reduzida e menor complacência pulmonar. (12) Por fim, vale ressaltar que pacientes com obesidade apresentam uma tendência a serem mais hipoxêmicos e costumam ter múltiplas doenças crônicas diagnosticadas, tal como diabetes tipo 2, hipertensão arterial sistêmica, apneia obstrutiva do sono, dislipidemia e cardiopatias; a coexistência de tais comorbidades é considerada, também, como um motivo para o aumento da gravidade evolutiva da COVID-19 nesses pacientes. (5,17)

Figura 1: Mecanismos fisiopatológicos que poderiam justificar a maior gravidade da COVID-19 no paciente obeso



1.3. A AÇÃO DO SARS-COV-2 NAS CÉLULAS PULMONARES

A infecção causada pelo SARS-CoV-2 inicia quando o vírus atinge a mucosa das vias aéreas superiores, rica em receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2). Entretanto, os casos graves de COVID-19 estão associados a infecção do epitélio respiratório distal, representado, basicamente, por células conhecidas como pneumócitos tipo II, responsáveis não só pela produção de surfactante pulmonar, como também pela manutenção do funcionamento básico do epitélio respiratório. (20,21) Além disso, o vírus tem capacidade de penetrar nos macrófagos alveolares, células de primeira linha na defesa do trato respiratório inferior. (22)

Após contaminação desses subtipos celulares, a replicação viral ocorre de maneira intensa, especialmente nas primeiras 48 horas após contato com o vírus, induzindo morte celular em grande intensidade. Como consequência, há importante resposta inflamatória, oriunda especialmente da ativação da imunidade inata, caracterizada pela secreção de uma série de citocinas com potencial pró-inflamatório, incluindo as interleucinas 6, 8 e TNF- α . (23) Em sequência, ocorre indução de migração leucocitária, especialmente de monócitos e células T, com mais ativação de macrófagos alveolares, colocando em andamento um mecanismo de retroalimentação positiva baseado em morte celular, secreção de citocinas e indução inflamatória. (20,22)

Secundariamente, há ativação de mecanismos pró-trombóticos, principalmente por uma indução da cascata de coagulação, promovendo microtromboses nos vasos pulmonares. (24) Ocorre, também, lesão alveolar

e aumento da permeabilidade vascular, promovendo um inundamento alveolar e dificuldade de troca gasosa, com hipoxemia e retenção de gás carbônico, cuja manifestação clínica se dá pela síndrome da angústia respiratória aguda (SARA). (20)

As autópsias pulmonares de pacientes que morreram por COVID-19 apresentam, comumente, dano alveolar difuso com desenvolvimento de membrana hialina, hemorragia alveolar associada a angiogênese intensa e microtromboses na circulação pulmonar nos casos mais agudos. (23,25) Nos casos mais crônicos e de maior período de evolução, já é possível identificar fibrose intersticial. (24)

1.4.O INFLAMASSOMA NLRP3 E SUA RELAÇÃO TANTO COM A OBESIDADE QUANTO COM A COVID-19

Estudos recentes correlacionaram a obesidade com a ativação de uma via inflamatória específica chamada de via do inflamassoma NLRP3. Esses estudos têm questionado se a ativação dessa via inflamatória específica, derivada de uma desregulação da produção de adipocinas, não poderia ser um mecanismo indutor da inflamação crônica basal encontrada na obesidade. (3,11,26) O inflamassoma também tem sido descrito como a principal via inflamatória desencadeada pelo SARS-CoV-2 ao penetrar nas células humanas. (15,27)

O inflamassoma consiste em um complexo multiproteico com função essencial na imunidade inata, de forma que ele estabelece um papel crítico na defesa do ser humano contra bactérias, fungos e vírus. (28–30). O subtipo de inflamassoma NLRP3 é o mais comumente ativado no organismo, sendo

identificada sua ativação tanto em pacientes obesos quanto em pacientes com infecção pela COVID-19. (29,31–33) O inflamassoma NLRP3 é assim chamado devido as três estruturas proteicas que o formam: receptores tipo NOD, mais especificamente o subtipo NALP ou NLRP3, a proteína adaptadora ASC com um domínio CARD e a pró-caspase 1. (34)

Para que ocorra a ativação do inflamassoma, dois sinais independentes são necessários. O sinal inicial ou desencadeador começa através do reconhecimento de moléculas conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs). (29,34) No caso da infecção pelo SARS-CoV-2, o vírus é reconhecido pelas células da imunidade inata através de PAMPs, que se ligam a receptores celulares conhecidos como receptores tipo-Toll (TLR) subtipos TLR3, TLR7 e TLR8. (28) (Figura 2).

As citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 e cristais de colesterol e ácido úrico também são capazes de se ligar aos seus respectivos receptores celulares e funcionar como primeiro sinal de ativação do inflamassoma. (7,29,30) Porém, esse sinal inicial raramente é suficiente para promover uma ativação plena do inflamassoma; o segundo sinal que leva a montagem final e ativação verdadeira do inflamassoma ocorre pela liberação extracelular de ATP, que ativa o receptor P2X7 localizado nas membranas plasmáticas celulares. (35,36)

Nos pacientes obesos, os adipócitos hiperplásicos e disfuncionais favorecem uma lipólise exacerbada que resulta em alta concentração de ácidos graxos séricos, que servem como gatilho para a formação de cristais

de colesterol. Tanto os ácidos graxos quanto os cristais de colesterol são partículas que funcionam como primeiro sinal para formação do complexo multiproteico do inflamassoma NLRP3. (5,37)

A presença de dois sinais diferentes induz a ativação de uma via de transcrição gênica conhecida como via do fator nuclear kappaB (NF-κB), que possibilita a indução da transcrição dos componentes proteicos do inflamassoma NLRP3. (29) Inicialmente, o NLRP3 (ou NALP) recruta e interage com a proteína ASC; por sua vez, após a interação dessas duas proteínas, a pró-caspase 1 se liga ao domínio CARD do complexo NALP-ASC. Essa última ligação é crítica para que ocorra a formação do complexo inflamassoma plenamente ativo, que resultará, em última instância, na clivagem da pró-caspase 1 em caspase-1 (CASP-1). (15,31,32) A ativação da via do NF-κB promove, também, a modulação da expressão gênica de citocinas como IL-6, IL-8 e TNF-α, promovendo um feedback positivo na secreção de citocinas e prolongando o processo inflamatório. (29)

Após a montagem e pleno funcionamento desse complexo multiproteico, a ativação da enzima pró-caspase 1 em CASP-1 leva a dois processos fundamentais na via do inflamassoma: primeiramente, a caspase-1 é responsável pela conversão da pró-interleucina 1-β em interleucina 1-β (IL-1β) e da pró-interleucina 18 em interleucina 18 (IL-18), que são as duas principais citocinas oriundas da ativação do inflamassoma. (34)

O segundo processo fundamental derivado da ativação da CASP-1 consiste na clivagem da proteína gasdermina D (GASD-D), resultando na liberação de proteínas terminais de gasdermina que são essenciais para a

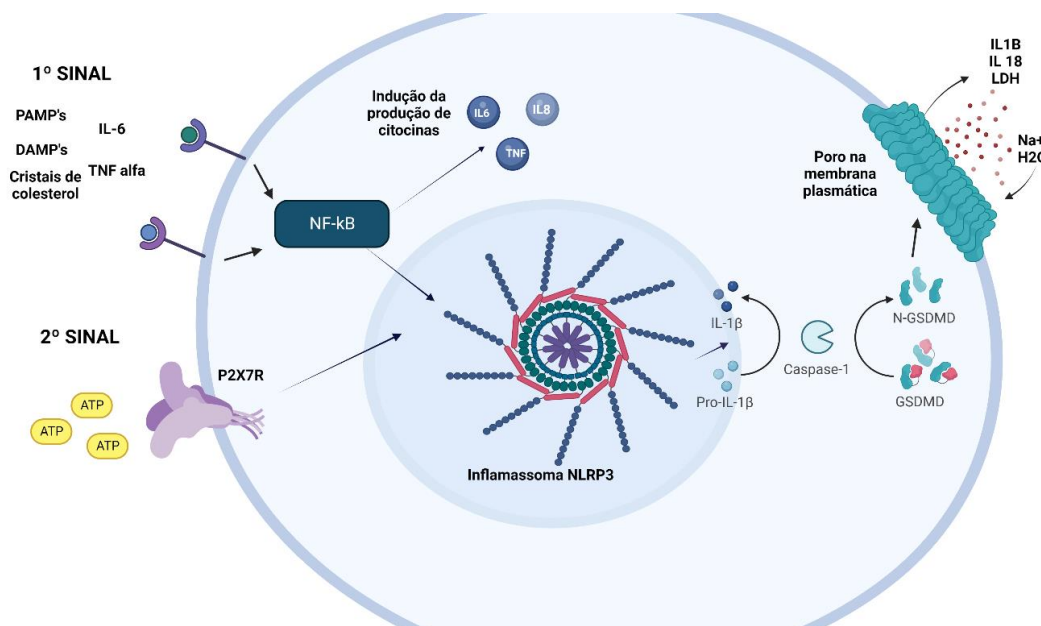
confecção de poros na membrana plasmática das células. (38) Esses poros levam ao extravasamento de conteúdo citoplasmático para o meio extracelular, além de permitir o influxo de sódio e água, que causam edema celular a ponto de promover a ruptura da mesma (Figura 3). (28–30,38)

O processo de formação de poros na membrana plasmática celular induz uma forma peculiar de morte celular programada conhecida como piroptose. (28–30,38,39) Nessa condição, a membrana plasmática está comprometida, permitindo o extravasamento de grandes quantidades de IL-1 β , IL-18 e lactato desidrogenase (LDH). Inclusive, tais citocinas e o LDH tem sido usados como moléculas marcadoras do fenômeno de morte celular via piroptose. (28,30)

No caso da COVID-19, a piroptose disseminada de células como macrófagos, pneumócitos tipo 2 e células endoteliais infectadas pelo SARS-CoV-2 leva a uma liberação intensa de partículas virais, citocinas, moléculas de LDH e espécies reativas de oxigênio, desencadeando uma reação imunológica em cadeia, na qual essas partículas ativam novamente a formação do complexo do inflamassoma NLRP3 e a piroptose de outras células. A piroptose favorece a disseminação na circulação de componentes virais e citocinas que mantem a ativação prolongada da inflamação, a ponto de induzir uma resposta inflamatória sistêmica grave, caracterizada por uma tempestade de citocinas e disfunção endotelial disseminada, que induz não só uma síndrome da angústia respiratória aguda, como desencadeia disfunção orgânica múltipla e morte. (28,30)

Pacientes obesos sabidamente são portadores de um quadro inflamatório crônico com secreção consistente de citocinas pró-inflamatórias. Questiona-se, portanto, se o sistema imune inato em pacientes obesos, por estar em um suposto estado de ativação parcial do inflamassoma, ao ser sobreposto a uma infecção pelo SARS-CoV-2, não desenvolveria mais facilmente uma secreção exacerbada de citocinas mediadas por uma piroptose intensa (7,29) e se esse não seria o principal motivo que justificaria os achados que a COVID-19 evolui mais gravemente no paciente obeso quando comparado ao eutrófico. (27,40)

Figura 2: Esquema ilustrativo representando a via de ativação do inflamassoma resultando em morte celular por piroptose



1.5. HIF-1 α COMO MODULADOR DA ATIVAÇÃO DA VIA DO INFLAMASSOMA NLRP3

É reconhecido, além de tudo, que pacientes obesos são hipoxêmicos crônicos dado o aumento desigual da massa de tecido adiposo com relação a

vascularização, o que gera uma desproporção células-vasos com isquemia tecidual e também devido às questões anatômicas, que elevam o risco de síndrome da apneia do sono e ciclos contínuos de hipoxemia (12,41,42). Pesquisas têm constatado que a hipóxia é, por si só, uma indutora de inflamação no paciente obeso, pois promove uma ativação expressiva de um fator de transcrição gênica conhecido como HIF, ou seja, fator induzível pela hipóxia. (42,43). Ele consiste em um fator de transcrição gênica heterodimérico, cuja subunidade alfa (subdividida em HIF-1 α e HIF-2 α) tem sua produção regulada diretamente pela concentração de oxigênio tecidual e cuja subunidade beta (HIF-1 β) tem expressão constitutiva, ou seja, sua secreção não é alterada pela hipóxia. (41)

Quando a concentração da subunidade alfa se eleva no núcleo celular em resposta a hipóxia há indução da transcrição gênica de genes específicos hipóxia-induzidos, cujas funções consistem em ativar mecanismos celulares de adaptação a baixas concentrações de oxigênio. Na obesidade, a elevada expressão do HIF-1 α promove uma possível ativação associada da via no NF-kB, que resulta, eventualmente, na produção do complexo multiproteico do inflamassoma. Essa ativação da via do NF-kB pelo HIF-1 α já foi demonstrada em outras doenças, sendo questionado, inclusive, se o HIF-1 α não seria um possível modulador da ativação da via do inflamassoma. (44) A ativação dessas duas vias causa uma reprogramação de macrófagos, induzindo infiltração tecidual e conseqüentemente uma secreção marcadamente maior de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e o TNF α . (41,42,45) Dados da literatura demonstram que ratos com deleção específica do HIF-1 α tem uma

diminuição da concentração de marcadores inflamatórios no tecido adiposo.

(42)

A infecção pelo SARS-CoV-2 é capaz de promover um importante comprometimento respiratório com hipóxia aguda dos tecidos, especialmente pela dificuldade de troca gasosa nos alvéolos inflamados na vigência de lesão pulmonar (46). Em pacientes obesos que desenvolvem uma infecção aguda pelo SARS-CoV-2, acredita-se que a via do HIF-1 α , previamente ativada, receberia um feedback positivo que leva a uma ativação canônica da mesma, podendo ser mecanismo auxiliar no estabelecimento da tempestade de citocinas tão clássica dos quadros graves da COVID-19. (41,45)

A via de transcrição gênica do HIF é bastante dual e pode gerar tanto respostas pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias, a depender do estímulo recebido. Na vigência de uma depleção crônica de oxigênio, como no caso de um obeso, se as células recebem um insulto agudo, como uma infecção viral, a ativação da via do HIF-1 α tende a promover respostas pró-inflamatórias e estimular a secreção de citocinas. (46) Novamente, é difícil não questionar se a ativação prévia do HIF-1 α no paciente obeso não estaria relacionado ao um desfecho mais reservado em pacientes com obesidade. (41,46)

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a ativação da via do inflamassoma NLRP3 em participantes obesos que vieram a óbito por COVID-19 e a implicação desse trajeto inflamatório na resposta inflamatória pulmonar.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desse trabalho são:

- Descrever a ativação da via do inflamassoma no tecido pulmonar de participantes obesos que vieram a óbito por COVID-19 comparando com a ativação no grupo controle de pacientes obesos sem COVID-19.
- Avaliar a ativação do HIF-1 α no tecido pulmonar de participantes obesos com COVID-19, comparando com a imunoexpressão no grupo controle de pacientes obesos sem COVID-19.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) pelo parecer número 3.944.734/2020, sendo caracterizado como um braço do Projeto de Pesquisa “COVID-19 – caracterização clínica e epidemiológica de pacientes atendidos em Curitiba-PR”.

A pesquisa foi desenvolvida a partir de amostras de tecido pulmonar de participantes obesos que morreram por COVID-19 no Hospital Marcelino Champagnat, Curitiba, Brasil, entre os anos de 2020 e 2021. Para tanto, o familiar responsável legal do participante foi informado e convidado a participar do estudo, permitindo acesso a dados clínicos e epidemiológicos a partir da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e também autorizando a realização de uma coleta minimamente invasiva de tecido pulmonar após o óbito. Para composição do grupo controle, composto por pacientes obesos sem COVID-19, utilizamos amostras de tecido pulmonar obtidas do banco de amostras teciduais parafinadas de necropsias

do Complexo do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR).

3.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos no estudo participantes que internaram no Hospital Marcelino Champagnat a partir de abril de 2020 até julho de 2021 e que apresentaram todos os critérios a seguir:

- Idade maior ou igual a 18 anos;
- Admissão hospitalar por COVID-19 confirmada através de teste de RT-PCR (transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase) positivo para SARS-CoV-2 e/ou tomografia de tórax sugestiva de pneumonia viral;
- IMC igual ou maior a 30 kg/m², valor definidor de obesidade conforme a OMS;
- Tempo de coleta de amostra de tecido pulmonar inferior a 4 horas após o óbito;
- TCLE assinado pelo familiar permitindo a autópsia com coleta de tecido pulmonar;

Foram excluídos do estudo os participantes que apresentaram os seguintes achados:

- Participantes com outras doenças virais, incluindo hepatite B, hepatite C, HIV ou outros vírus respiratórios comuns;
- Participantes com COVID-19 que vieram a óbito por outras condições patológica que não a COVID-19 ou suas possíveis complicações.

Para composição do grupo controle de participantes obesos sem COVID-19, incluímos no estudo os participantes que preenchiam os seguintes critérios de inclusão:

- Idade maior ou igual a 18 anos;
- IMC igual ou maior a 30 kg/m² ou descrição em prontuário como participante portador de obesidade;

Foram excluídos do grupo controle os participantes que apresentaram os seguintes critérios:

- Participantes que vieram a óbito por COVID-19;
- Ausência de descrição em prontuário do IMC ou classificação referente a antropometria.
- Participantes com outras doenças virais, incluindo hepatite B, hepatite C, HIV ou outros vírus respiratórios comuns;

3.2. COLETA DE DADOS CLÍNICOS

Todos os participantes incluídos no estudo tiveram seus dados clínicos e epidemiológicos coletados a partir dos prontuários médicos durante o período de internação hospitalar. Foram obtidos e tabulados os seguintes dados: idade, sexo, comorbidades, IMC, medicações de uso contínuo, data de início dos sintomas, data de positividade do RT-PCR para SARS-CoV-2, medicações usadas para COVID-19 antes do internamento hospitalar, tomografia computadorizada da admissão, dados laboratoriais na admissão, tempo de internamento hospitalar, tempo de ventilação mecânica, procedimentos invasivos realizados durante internamento (necessidade de

hemodiálise, traqueostomia, fibrinólise, etc.), tratamentos usados durante o internamento (anticoagulação full, dexametasona, etc.), dados laboratoriais 24 horas antes do óbito e data do óbito.

3.3. COLETA DAS AMOSTRAS DE TECIDO PULMONAR

As amostras de tecido pulmonar dos participantes que se adequaram a todos os critérios de inclusão foram coletadas por um médico cirurgião torácico no Hospital Marcelino Champagnat. As coletas foram realizadas a partir de uma técnica de necropsia minimamente invasiva, caracterizada por uma mini-toracotomia anterior esquerda com ressecção de segmento de lobo superior esquerdo, com aproximadamente 3x3 cm de diâmetro. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em frascos contendo solução de formalina 10%, sendo posteriormente embebidas e emblocadas em parafina para análise histológica e imunohistoquímica.

3.4. COLETA DE DADOS DO GRUPO CONTROLE

Os fragmentos pulmonares desse grupo foram obtidos do banco de amostras teciduais parafinadas de necropsias do Complexo do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR). Todas as amostras haviam sido previamente coletadas durante necropsia emblocadas em parafina, estando, dessa maneira, preservadas no banco de amostras para uso em estudos diversos.

Os dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos, também, através de pesquisa direta nos laudos de necropsia. Devido a diferença de quantidade de amostras, não foi possível obter pareamento numérico em relação ao grupo de obesos com COVID-19.

3.5. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os padrões anatomopatológicos encontrados nas amostras do presente estudo foram revisados em lâminas coradas em hematoxilina e eosina – H&E (Hematoxilina de Harris: NewProv, Cód. PA203, Paraná, BR; Eosina: BIOTEC Reagentes Analíticos, Cód. 4371, Paraná, BR). A análise foi feita com o microscópio óptico Olympus BX40.

3.6. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

O ensaio de imunohistoquímica foi precedido pela confecção de blocos teciduais parafinados multiamostrais ou TMA (do inglês, *tissue microarray*). As áreas representativas dos pulmões foram previamente demarcadas e identificadas nas lâminas de H&E e, após, fragmentos cilíndricos medindo aproximadamente 0,3 cm de diâmetro de tais áreas foram extraídos dos blocos originais (bloco doadores) e organizados em blocos de TMA (blocos receptores), que passam a conter, então, diversas amostras em um único bloco parafinado.

Então, as mesmas amostras multiamostrais de tecidos pulmonar emblocadas em parafina e posteriormente cortadas foram submetidas a avaliação imunohistoquímica com anticorpos mono e policlonais. Estão sendo avaliados no estudo os seguintes biomarcadores e/ou moléculas: IL 6, IL 8, TNF α , NALP (NLRP3), IL-18, IL-1 β , gasdermina D e HIF 1- α .

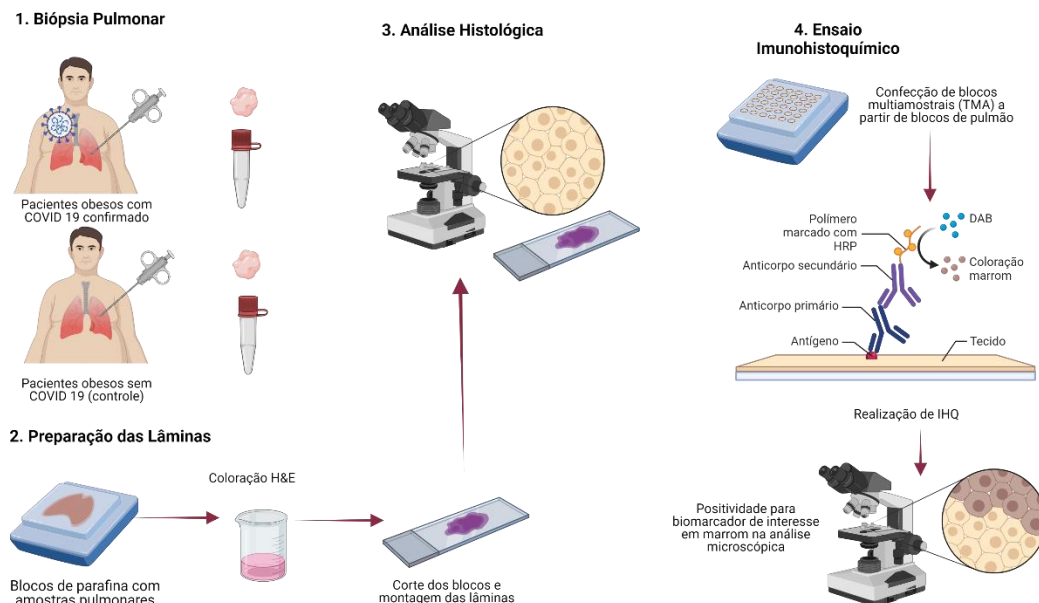
O ensaio de imunohistoquímica baseou-se em um protocolo de incubação de anticorpos primários (Tabela 1) em câmara úmida, com temperatura entre 2° e 8°C, overnight. O polímero secundário (Mouse/Rabbit PolyDetector DAB HRP Brown Detection System, BioSB, Santa Barbara,

CA) é aplicado no material por cerca de 25 minutos em temperatura ambiente. Após, é feita a revelação da técnica com a adição do complexo 2,3, diaminobenzidina + substrato de peróxido de hidrogênio por tempo suficiente para desenvolvimento da cor castanha, seguida da contra-coloração com Hematoxilina de Harris. Os resultados são, então, confirmados pela reatividade de um controle positivo, situação na qual uma amostra tecidual com imunoexpressão sabidamente positiva para o anticorpo é alocada juntamente com as amostras testadas (Figura 2).

Quadro 1: Especificações acerca dos anticorpos que foram usados para a técnica de imunohistoquímica

Anticorpo	Tipo	Clone/Código	Diluição	Fabricante
Anti-IL-6	Monoclonal/Rato	Ab9325	1:400	Abcam
Anti-IL-8	Monoclonal/Rato	807	1:200	Abcam
Anti-TNF- α	Monoclonal/Rato	TA20	1:50	Santa Cruz
Anti-NALP	Policlonal/Cabra	ab4207	1:100	Abcam
Anti-IL-18	Policlonal/Coelho	EC9312	1:200	Elabscience
Anti-IL-1 β	Policlonal/Coelho	A16288	1:800	ABclonal
Anti-Gasdermina	Policlonal/Coelho	A18281	1:100	ABclonal
Anti-HIF	Monoclonal/Coelho	EP118	1:200	BioSB

Figura 3: Esquema ilustrativo da metodologia desenvolvida



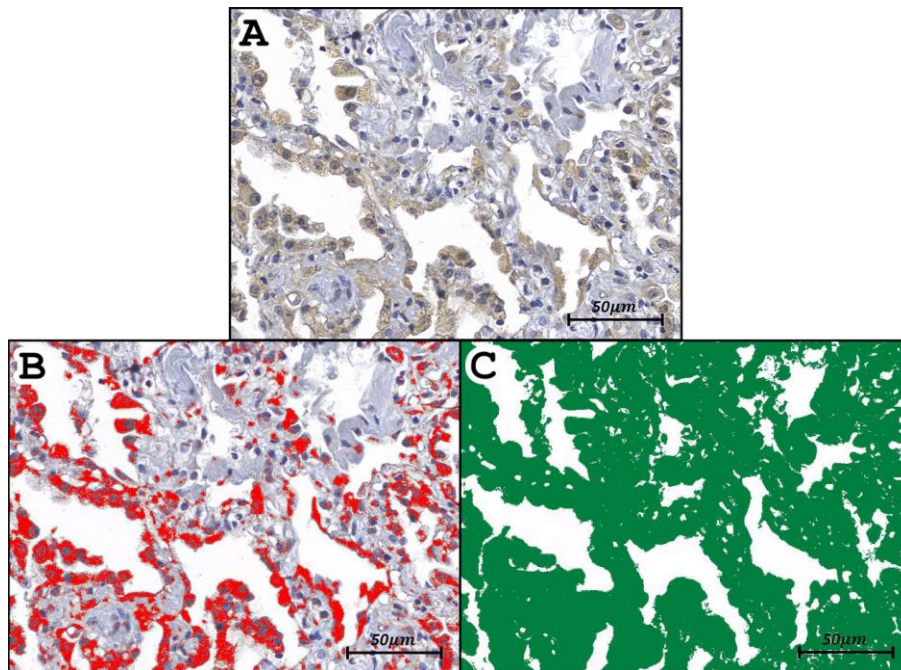
3.7. DIGITALIZAÇÃO E ANÁLISE DAS IMAGENS

As lâminas imunomarcadas com anti-IL-6, anti-IL-8, anti-TNF- α , anti-NALP, anti-IL-1 β , anti-IL-18, anti-gasdermina e anti-HIF, foram escaneadas com o auxílio do escâner de lâminas Axio Scan.Z1 (Zeiss, Jena, Alemanha) e então submetidas a geração de 30 imagens em CGA (campo de grande aumento) no caso do grupo COVID-19 e 20 imagens em CGA no caso do grupo controle, pelo software ZEN Blue Edition (Zeiss, Jena, Alemanha). As análises foram realizadas de modo cego, sendo as imagens geradas obtidas de regiões amostrais aleatórias sem a interferência de um observador.

De cada CGA, houve a mensuração das áreas de imunoexpressão pelo software Image Pro-Plus versão 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, MD), através do emprego de um método de segmentação semiautomatizada por cores, na qual a área de imunoexpressão tecidual para cada biomarcador foi artificialmente delimitada e quantificada. Posteriormente, seu valor, expresso em micrômetros quadrados (μm^2) foi dividido pelo valor de sua respectiva área de

tecido total (Figura 4) e finalmente transformado em um valor percentual, sendo expresso na seguinte fórmula matemática: valor percentual = $\left(\frac{\text{Área imunopositiva}}{\text{Área tecido total}} \right) \times 100$. Por fim, foram calculados os valores de média aritmética dos CGA de cada participante, de maneira que seus resultados foram organizados em planilhas de Excel e posteriormente submetidos à análise estatística.

Figura 4: Composição demonstrando os processos da segmentação semiautomatizada por cores.



Fonte: Imagem gentilmente cedida por Seigo Nagashima.

A: Imagem digitalizada de uma lâmina imunomarcada para exemplificar o processo de leitura semiautomatizada das lâminas digitalizadas. **B:** Imagem anterior, cuja área de imunoe expressão foi delimitada artificialmente pela cor vermelha, com o intuito da quantificação do seu valor. **C:** Imagem anterior, cuja área total foi delimitada artificialmente pela cor verde, com o intuito da quantificação do seu valor.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A condição de normalidade foi avaliada a partir do teste D'Agostino & Pearson. A comparação não paramétrica para as variáveis contínuas entre dois grupos dicotômicos foi realizada por meio do teste de Mann-Whitney para amostras independentes, caracterizados pela mediana, amplitude interquartilica, valores mínimo e máximo. O teste paramétrico para as variáveis contínuas demográficas e clínicas entre dois grupos dicotômicos, realizado por meio do teste t de Student para amostras independentes, foi caracterizado por valores de média e desvio padrão. A associação entre duas variáveis categóricas foi analisada usando-se o teste exato de Fisher, sendo seus valores caracterizados por valores absolutos e frequências. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados utilizando o software JMP (™). Pro 14.0.0. (SAS Institute, Cary, NC).

3.9. NOMENCLATURA DOS GRUPOS

Para melhor descrição dos resultados, nomeamos os grupos da seguinte maneira:

- Grupo A: composto pelos participantes obesos que vieram a óbito por COVID-19
- Grupo B: composto pelos participantes obesos sem COVID-19 que vieram a óbito por outras causas.

4. RESULTADOS

4.1. DADOS CLÍNICOS

Os dados clínicos dos participantes do grupo A estão representados na Tabela 2. A maioria dos participantes é do sexo masculino, com 11

participantes homens (78,5%) e apenas 3 mulheres; a idade média dos participantes do grupo COVID-19 é de 67 anos e a mediana é 68 anos. O IMC médio dos participantes é de 34,12 kg/m². Do total de 14 participantes, 9 foram diagnosticados e vieram a óbito por COVID-19 no ano de 2020, caracterizados como pertencentes a primeira onda da pandemia. Os outros 5 participantes remanescentes, por sua vez, vieram a óbito no ano de 2021, sendo caracterizados como pertencentes a segunda onda da pandemia. O tempo médio de ventilação mecânica antes do óbito foi de 14,6 dias. As comorbidades prévias mais prevalentes na presente amostra foram a hipertensão arterial sistêmica (85,7%), diabetes mellitus tipo 2 (35,7%) e dislipidemia (28,5%).

Quadro 2: Dados Clínicos do Grupo A

	Participante 1	Participante 2	Participante 3
Idade	80 anos	57 anos	75 anos
Sexo	Masculino	Masculino	Feminino
Comorbidades	DAC e RVM prévias, ICFER, HAS, dislipidemia, FA crônica em anticoagulação, SAHOS, DPOC, insuficiência venosa crônica, epilepsia.	HAS, DM tipo 2, transtorno de ansiedade	Asma, DPOC, Ex-tabagista, HAS, IAM com ICC, DM, hipotireoidismo, Implante MP em fevereiro de 2020 por IAM com BAVT, DRC, Dislipidemia.
IMC	41,54	35,23	31,16
MUC	AAS 10 mg/dia, Pitavastatina 4 mg/dia, Metoprolol 50 mg/dia, Rivaroxabana 20 mg/dia, Trimetazina 35 mg, Ezetimiba 10 mg, Diosmina e hesperidina (sem dose no prontuário), Beclometasona + formoterol aerossol 2x/dia, Trazodona 150 mg/dia, Carbamazepina 400 mg/dia,	Losartana 100 mg/dia, AAS 100 mg/dia, Metformina 100 mg/dia, Pantoprazol 40 mg/dia, Bupropiona 150 mg/dia, Rosuvastatina (sem dose descrita no prontuário).	AAS 100 mg/dia, Ticagrelor 90 mg 2x/dia, Losartana 50 mg 2x/dia, Metoprolol 50 mg/dia, Espironolactona 25 mg/dia, Furosemida 40 mg/dia, Rosuvastatina 40 mg/dia, Levotiroxina 50 mcg/dia, Insulina NPH 12 UI 2x/dia.
Início dos sintomas	07/abril	30/junho	25/junho
RT PCR positivo	10/abril	06/julho	29/junho
Tempo de VM	09/04/2020 - 29/04/2020	05/07/2020 - 14/07/2020	26/06/2020 - 04/07/2020

TAC na admissão	07/04: Características comuns de imagem de pneumonia por COVID-19 estão presentes (acometimento entre 25-50% dos pulmões) de maneira mais pronunciada em relação ao exame de março/2020.	30/06/2020: Diversas opacidades com atenuação em vidro fosco nos pulmões, predominantemente periféricas e acometendo menos de 25% do parênquima pulmonar, a maior localizada no lobo inferior do pulmão direito, com algumas opacidades reticulares de permeio, podendo corresponder a processo inflamatório/infeccioso de COVID-19.	26/06/2020: Opacidades pulmonares com atenuação em vidro fosco multifocais, periféricas, confluentes e bilaterais associado a espessamento dos septos inter e intra lobulares, predominando nos lobos superiores, língua e lobo médio, cujos achados podem estar relacionados a pneumonia viral por COVID-19, na dependência de correlação clínico-laboratorial. Consolidações pulmonares com broncogramas aéreos de permeio nos lobos inferiores, cuja possibilidade de processo infeccioso bacteriano sobreposto deve ser considerada no diferencial.
Dados laboratoriais na admissão	K 3,6 mEq/L Na 129 mEq/L Ureia 32 mg/dL Creatinina 0,86 mg/dL PCR 52 mg/L Hb 12,8 g/dL VG 37,5% 4.700/mm ³ leucócitos 4% bastões D-dímero 852 mcg/L	K 5,0 mEq/L Na 130 mEq/L Ureia 80 mg/dL Creatinina 0,82 mg/dL PCR 154,2 mg/L Hb 14 g/dL VG 38,3% 14.500/mm ³ leucócitos 9% bastões D-dímero 628 mcg/L	K 4,5 mEq/L Na 132 mEq/L Ureia 198,9 mg/dL Creatinina 8,22 mg/dL PCR 300,8 mg/L Hb 10,7 g/dL VG 30,1% 21.300/mm ³ leucócitos 6% bastões D-dímero 1652 mcg/L
Dados laboratoriais 24 horas antes do óbito	K 3,9 mEq/L Na 143 mEq/L Ureia 101,5 mg/dL Creatinina 1,33 mg/dL PCR 407,7 mg/L Hb 9,7 g/dL VG 29,4% 9.40/mm ³ leucócitos 11% bastões	K 5,8 mEq/L Na 110 mEq/L Ureia 67,2 mg/dL Creatinina 2,43 mg/dL PCR 267,2 mg/L Hb 9,0 g/dL VG 27% 15.300/mm ³ leucócitos 3% bastões	K 4,9 mEq/L Na 116 mEq/L Ureia 77,8 mg/dL Creatinina 3,24 mg/dL PCR 186,7 mg/L Hb 9,8 g/dL VG 28,1% 35.500/mm ³ leucócitos 15% bastões
Medicamentos usados para COVID na admissão	Não	Não	Não
Tratamentos durante internamento	Anticoagulação full com enoxaparina, hidroxicloroquina 800 mg/dia no primeiro dia e 400 mg/dia nos outros dias, azitromicina 500 mg/dia por 5 dias, ceftriaxona 2 g/dia; oseltamivir 150 mg/dia por 5 dias.	Azitromicina 500 mg/dia por 5 dias; Dexametasona 6 mg/dia; Ceftriaxona 2 g/dia.	Oseltamivir 150 mg/dia por 5 dias, Dexametasona 6 mg/dia por 10 dias, Ceftriaxona 2 g/dia por 7 dias, Azitromicina 500 mg/dia por 5 dias.
Procedimentos invasivos	Traqueostomia	Cardioversão elétrica por FAAR com instabilidade hemodinâmica, trombólise com alteplase devido a TEP maciço	Hemodiálise.
	Participante 4	Participante 5	Participante 6
Idade	64 anos	57 anos	57 anos
Sexo	Masculino	Masculino	Masculino
Comorbidades	DRC não dialítica, histórico de 2 transplantes renais (25 anos e 9 anos atrás), HAS, DAC com ATC prévia.	HAS	HAS, DM, Transtorno de ansiedade generalizado.
IMC	34,22	31,91	35,9
MUC	Micofenolato (sem dose em prontuário), Tacrolimus 2g/dia,	Indapamida 1,5 mg/dia	Metformina (sem dose em prontuário), Losartana 50 mg 2x/dia, Sertralina 50

	Prednisona 10 mg/dia, Furosemida 40 mg 2x/dia, AAS 100 mg/dia, Alopurinol 200 mg/dia, Xarelto 10 mg/dia, Dutasterida + tansulosina (sem dose em prontuário), Bactrim 800+160 mg (sem dose), Solifenacina 5 mg 2x/dia, Trimetazidina 35 mg 2x/dia, Rosuvastatina (sem dose), Enalapril 10 mg 2x/dia, Carvedilol 12,5 mg 2x/dia		mg/dia, Zolpidem (sem dose em prontuário).
Início dos sintomas	22/junho	06/junho	28/junho
RT PCR positivo	28/junho	08/junho	05/julho
Tempo de VM	07/07/2020 - 11/07/2020	12/06/2020 - 18/07/2020	07/07/2020 - 30/07/2020
TAC na admissão	03/07/2020: Características comuns de imagem de pneumonia por COVID-19 estão presentes. Padrão típico*. Acometimento pulmonar aproximado de 25-50%.	11/06/2021: Opacidades pulmonares com atenuação em vidro-fosco periféricas, multifocais e bilaterais, associadas a espessamento septal, por vezes com pequenos focos de consolidações de perimeio. Os aspectos por imagem, embora inespecíficos, podem representar processo pneumônico inflamatório/infeccioso (considerar etiologia viral). Extensão do acometimento pulmonar: moderado (25-50%).	05/07/2020: Opacidades pulmonares com atenuação em vidro-fosco, multifocais e bilaterais, confluentes, associadas a espessamento septal. Os aspectos por imagem, embora inespecíficos, podem representar processo pneumônico inflamatório/infeccioso (considerar etiologia viral). Extensão do acometimento pulmonar: acentuado (>50%).
Dados laboratoriais na admissão	K 4,3 mEq/L Na 129 mEq/L Ureia 118,6 mg/dL Creatinina 2,59 mg/dL PCR 66,2 mg/L Hb 11 g/dL VG 31% 4.000/ mm ³ leucócitos 0% bastões D-dímero 1599 mcg/L	K 3,4 mEq/L Na 133 mEq/L Ureia 35,6 mg/dL Creatinina 1,23 mg/dL PCR 47,7 mg/L Hb 15,8 g/dL VG 43,1% 7.400/ mm ³ leucócitos 0% bastões D-dímero 431 mcg/L	K 4,1 mEq/L Na 134 mEq/L Ureia 44,2 mg/dL Creatinina 0,78 mg/dL PCR 47,8 mg/L Hb 17,3 g/dL VG 47,8% 7.800/ mm ³ leucócitos 3% bastões
Dados laboratoriais 24 horas antes do óbito	K 4,6 mEq/L Na 130 mEq/L Ureia 168,9 mg/dL Creatinina 6,38 mg/dL PCR 392,5 mg/L Hb 10,7 g/dL VG 26,5% 9.800/ mm ³ leucócitos 7% bastões	K 5,3 mEq/L Na 126 mEq/L Ureia 101,5 mg/dL Creatinina 3,53 mg/dL PCR 281,6 mg/L Hb 7,8 g/dL VG 23,1% 15.800/ mm ³ leucócitos 38% bastões	K 5,6 mEq/L Na 114 mEq/L Ureia 118,3 mg/dL Creatinina 2,55 mg/dL PCR 236,2 mg/L Hb 9,3 g/dL VG 26,6% 25.000/ mm ³ leucócitos 16% bastões/
Medicamentos usados para COVID na admissão	Não	Não	Não
Tratamentos durante internamento	Ceftriaxona 2 g/dia por 7 dias, Azitromicina 500 mg/dia por 5 dias.	Oseltamivir 150 mg/dia por 5 dias, Ceftriaxona 2 g/dia por 7 dias, Azitromicina 500 mg/dia por 5 dias, Dexametasona 6 mg/dia, anticoagulação full (suspensão em 22/06 devido a sangramento de mucosa oral com queda de Hb e necessidade de transfusão)	Oseltamivir 150 mg/dia por 5 dias, Dexametasona 6 mg/dia por 10 dias, Ceftriaxona 2 g/dia por 5 dias, Azitromicina 500 mg/dia por 5 dias.
Procedimentos invasivos	Hemodiálise.	Traqueostomia.	Traqueostomia
	Participante 7	Participante 8	Participante 9
Idade	86 anos	72 anos	72 anos
Sexo	Masculino	Feminino	Feminino
Comorbidades	HAS, pré-DM, HPB, Dislipidemia.	HAS, DM, Hipotireoidismo	HAS, Dislipidemia.

IMC	33,2	31,11	34,57
MUC	AAS 100 mg/dia, Dutasterida + tansulosina (sem dose descrita no prontuário), Sinvastatina 20 mg/dia, Indapamida 1,5 mg/dia, Candesartan + anlodipino 16 mg + 2,5 mg/dia.	Valsartana 160 mg/dia, Metformina 850 mg 3x/dia, Bisoprolol 5 mg/dia, Pregabalina 75 mg 2x/dia, Levotiroxina 100 mcg/dia, Rosuvastatina 10 mg/dia.	Losartana 50 mg/dia, Sinvastatina 20 mg/dia.
Início dos sintomas	08/agosto	21/julho	30/julho
RT PCR positivo	13/agosto	25/julho	02/agosto
Tempo de VM	19/08/2020 - 21/08/2020	29/07/2020 - 24/08/2020	05/08/2020 - 24/08/2020
TAC na admissão	13/08/2020: Opacidades pulmonares com atenuação em vidro-fosco periféricas, multifocais e bilaterais. Os aspectos por imagem, embora inespecíficos, podem representar processo pneumônico inflamatório/infeccioso (considerar etiologia viral). Extensão do acometimento pulmonar: moderado (25-50%).	25/07/2020: Pulmões e brônquios segmentares: múltiplas áreas com atenuação em vidro fosco, multifocais, com distribuição predominantemente periférica em todos dos lobos, mais extensas nos lobos inferiores, algumas com linhas intralobulares visíveis (pavimentação em mosaico) e com múltiplos focos de consolidação de perimeio, aparentemente comprometendo cerca de 50% do parênquima pulmonar	02/08/2020: Angiotomografia negativa para tromboembolismo pulmonar. Opacidades pulmonares com atenuação em vidro-fosco periféricas, multifocais e bilaterais. Extensão do acometimento pulmonar: acentuado (>50%). Os aspectos por imagem, embora inespecíficos, podem representar processo pneumônico inflamatório/infeccioso (considerar etiologia viral).
Dados laboratoriais na admissão	K 4,4 mEq/L Na 128 mEq/L Ureia 89 mg/dL Creatinina 1,61 mg/dL PCR 86 mg/L Hb 13,6 g/dL VG 36,9% 5.300/ mm ³ leucócitos 2% bastões D-dímero 848 mcg/L	K 4,5 mEq/L Na 133 mEq/L Ureia 26,5 mg/dL Creatinina 0,75 mg/dL PCR 111,6 mg/L Hb 11,7 g/dL VG 34,1% 6.000/ mm ³ leucócitos 6% bastões D-dímero 575 mcg/L	K 4,7 mEq/L Na 131 mEq/L Ureia 73 mg/dL Creatinina 1,07 mg/dL PCR 114 mg/L Hb 11,6 g/dL VG 30,9% 5.900/ mm ³ leucócitos 5% bastões D-dímero 1.975 mcg/L
Dados laboratoriais 24 horas antes do óbito	K 3,3 mEq/L Na 137 mEq/L Ureia 177 mg/dL Creatinina 2,04 mg/dL PCR 168,7 mg/L Hb 14,1 g/dL VG 39,5% 4.700/ mm ³ leucócitos 3% bastões	K 4,9 mEq/L Na 111 mEq/L Ureia 115 mg/dL Creatinina 2,96 mg/dL PCR 329,9 mg/L Hb 8,5 g/dL VG 23,7% 32.200/ mm ³ leucócitos 22% bastões	K 4,2 mEq/L Na 118 mEq/L Ureia 135 mg/dL Creatinina 1,53 mg/dL PCR 53,9 mg/L Hb 7,7 g/dL VG 21,2% 7.900/ mm ³ leucócitos 6% bastões
Medicamentos usados para COVID na admissão	Não	Azitromicina e prednisona	Não
Tratamentos durante internamento	Ceftriaxona 2 g/dia por 7 dias, Azitromicina 500 mg/dia por 5 dias, Dexametasona 6 mg/dia.	Oseltamivir 150 mg/dia por 5 dias, Dexametasona 6 mg/dia por 10 dias, anticoagulação em dose profilática.	Oseltamivir 150 mg/dia por 5 dias, Dexametasona 6 mg/dia por 10 dias, Ceftriaxona 2 g/dia por 5 dias, Azitromicina 500 mg/dia por 5 dias, anticoagulação full por suspeita de TEP.
Procedimentos invasivos	Não	Traqueostomia, hemodiálise	Traqueostomia
	Participante 10	Participante 11	Participante 12
Idade	54 anos	57 anos	79 anos
Sexo	Masculino	Masculino	Masculino

Comorbidades	HAS, AVC isquêmico cardioembólico (FOP), Hipotireoidismo	Nega	DM 2, HAS
IMC	32,24	38,8	33,7
MUC	Dabigatrana 150 mg 12/12 horas, Atorvastatina 40 mg/dia, Desvenlafaxina 100 mg/dia, Trazodona 150 mg/dia, Pregabalina 75 mg/dia, Naltrexona 50 mg/dia, Levotiroxina 50 mcg/dia	Nega	Metoprolol 25 mg/dia, Losartana 100 mg/dia, Hidroclorotiazida 25 mg/dia, Empaglifozina 25 mg/dia, Noretisterona transdérmico (adesivo), Liraglutida + insulina degludeca.
Início dos sintomas	22/fevereiro	22/fevereiro	19/fevereiro
RT PCR positivo	23/fevereiro	23/fevereiro	Externo 22/02
Tempo de VM	08/03/2021 a 15/03/2021	01/03/2021 - 13/03/2021	01/03/2021 - 17/03/2021
TAC na admissão	05/03/2021: No período de controle surgiram múltiplas opacidades pulmonares com atenuação em vidro-fosco periféricas, multifocais e bilaterais, associadas a espessamento septal, por vezes com pequenos focos de consolidações de permeio. Os aspectos por imagem, embora inespecíficos, podem representar processo pneumônico inflamatório/infeccioso (considerar etiologia viral). Extensão do acometimento pulmonar: acentuado (>50%). Espessamento difuso de paredes brônquicas.	28/02/2021: Opacidades pulmonares com atenuação em vidro-fosco bilaterais, associadas a espessamento septal, por vezes com focos de consolidações de permeio. Os aspectos por imagem, embora inespecíficos, podem representar processo pneumônico inflamatório/infeccioso (considerar etiologia viral). Extensão do acometimento pulmonar: moderado (25-50%).	27/02/2021: Opacidades pulmonares com atenuação em vidro-fosco periféricas, multifocais e bilaterais, associadas a espessamento septal, por vezes com pequenos focos de consolidações de permeio. Os aspectos por imagem, embora inespecíficos, podem representar processo pneumônico inflamatório/infeccioso (considerar etiologia viral). Extensão do acometimento pulmonar: leve (<25%). Espessamento das paredes brônquicas bilateral. ANGIOTAC 27/02: 1. Exame negativo para tromboembolismo pulmonar.
Dados laboratoriais na admissão	K 4,0 mEq/L Na 131 mEq/L Ureia 42 mg/dL Creatinina 1,04 mg/dL PCR 79,5 mg/L Hb 13,9 g/dL VG 38,8% 8.600/ mm ³ leucócitos 2% bastões D-dímero 290 mcg/L	K 4,4 mEq/L Na 132 mEq/L Ureia 32 mg/dL Creatinina 1,12 mg/dL PCR 103,8 mg/L Hb 13,5 g/dL VG 38,3% 4.500/ mm ³ leucócitos 0% bastões D-dímero 290 mcg/L	K 3,3 mEq/L Na 135 mEq/L Ureia 55 mg/dL Creatinina 1,39 mg/dL PCR 54,5 mg/L D-dímero 1822 Hb 16,3 g/dL VG 47,5% 4.500/ mm ³ leucócitos 1% bastões
Dados laboratoriais 24 horas antes do óbito	K: 6,7 mEq/L Na 137 mEq/L Ureia 245 mg/dL Creatinina 5,33 mg/dL PCR 175,7 mg/L Hb 13,1 g/dL VG 36,9% 26.200/ mm ³ leucócitos 11% bastões	K 5,4 mEq/L Na 134 mEq/L Ureia 107 mg/dL Creatinina 3,81 mg/dL PCR 227,9 mg/L Hb 9,6 g/dL VG 28,3% 13.500/ mm ³ leucócitos 0% bastões.	K 7,2 mEq/L Na 134 mEq/L Ureia 147 mg/dL Creatinina 3,88 mg/dL PCR 219,8 mg/L Hb 9,3 g/dL VG 29% 34.500/ mm ³ leucócitos 10% bastões
Medicamentos usados para COVID na admissão	Não	Não	Não
Tratamentos durante internamento	Anticoagulação full com enoxaparina 80 mg 12/12 horas; dexametasona	Dexametasona, anticoagulação full	Dexametasona, anticoagulação profilática
Procedimentos invasivos	Hemodiálise	Hemodiálise, traqueostomia.	Hemodiálise.
		Participante 13	Participante 14
Idade	51 anos		77 anos
Sexo	Masculino		Masculino
Comorbidades	HAS, Linfoma em tórax tratado em 2019 em remissão, Ex-tabagista		Doença de Parkinson, AVC (infarto lacunar no globo pálido direito janeiro/21)
IMC	34,3		30,07
MUC	Nega - descontinuou atenolol 50 mg/dia por conta própria há 1 ano		Prolopa 200/50, Duloxetine 60 mg/dia, Rasagilina 1 mg/dia, Rotigotina (sem dose no prontuário)

Início dos sintomas	06/mar	17/mar
RT PCR positivo	06/mar	17/mar
Tempo de VM	18/03/2021 - 27/03/2021 01/04/2021 - 09/04/2021	20/03/2021- 30/03/2021 04/04/2021 - 13/04/2021
TAC na admissão	17/03/2021: Opacidades pulmonares com atenuação em vidro-fosco periféricas, multifocais e bilaterais, associadas a espessamento septal, por vezes com pequenos focos de consolidações de permeio. Os aspectos por imagem, embora inespecíficos, podem representar processo pneumônico inflamatório/infeccioso (considerar etiologia viral). Extensão do acometimento pulmonar: acentuado (>50%).	30/03/2021: Exame negativo para tromboembolismo arterial pulmonar. Focos de opacidades em vidro fosco de formato irregular e distribuição periférica, comprometendo ambos os pulmões e predominando nos terços médios e inferiores, alguns com associado espessamento liso de septos intralobulares, caracterizando o padrão de pavimentação em mosaico, com associadas consolidações de permeio.
Dados laboratoriais na admissão	K 3,9 mEq/L Na 135 mEq/L Ureia 36 mg/dL Creatinina 0,64 mg/dL PCR 129,4 mg/L Hb 14,3 g/dL VG 43% 18.200/ mm ³ leucócitos 0% bastões D-dímero 342 mcg/L	K 4,6 mEq/L Na 130 mEq/L Ureia 65 mg/dL Creatinina 0,74 mg/dL PCR 104,7 mg/L Hb 12,4 g/dL VG 36,3% 10.000/ mm ³ leucócitos 0% bastões D-dímero 774 mcg/L
Dados laboratoriais 24 horas antes do óbito	K 4,9 mEq/L Na 137 mEq/L Ureia 43 mg/dL Creatinina 0,79 mg/dL PCR 194,3 mg/L Hb 9,7 g/dL VG 29,1% 14.400/ mm ³ leucócitos 5% bastões	K 5,1 mEq/L Na 129 mEq/L Ureia 72 mg/dL Creatinina 0,59 mg/dL PCR 115,7 mg/L Hb 8,6 g/dL VG25,7% 11.400/ mm ³ leucócitos 3% bastões
Medicamentos usados para COVID na admissão	Não	Prednisona, rivaroxabana e moxifloxacina
Tratamentos durante internamento	Dexametasona, anticoagulação full	Dexametasona, anticoagulação full (suspensa 02/04 devido a hematúria franca/ após iniciado anticoagulação profilática)
Procedimentos invasivos	Traqueostomia	Traqueostomia

Siglas: MUC: medicações de uso contínuo; VM: ventilação mecânica; TAC: tomografia computadorizada; K: potássio; Na: sódio; PCR: proteína C reativa; HB: hemoglobina; VH: volume globular; HAS: hipertensão arterial sistêmica, AVC: acidente vascular encefálico, DM 2: diabetes mellitus tipo 2; HPB: hiperplasia prostática benigna; DRC: doença renal crônica; FAAR: fibrilação atrial de alta resposta; DAC: doença arterial coronariana; RVM: revascularização do miocárdio; ICFER: insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida; FA: fibrilação atrial; SAHOS: síndrome da apneia ou hipopneia obstrutiva do sono; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica; ICC: insuficiência cardíaca congestiva; BAVT: bloqueio atrioventricular total; MP: marca-passo, IAM: infarto agudo do miocárdio.

Os dados clínicos dos participantes do grupo B incluídos no estudo encontram-se dispostos na Tabela 3. Foram selecionados um total de 9 participantes para compor essa amostra, também de maioria masculina: 6 homens (66,6%) e apenas 3 mulheres. A idade média desse grupo é de 62,6 anos com mediana de 65 anos. O prontuário desses participantes não

apresentava a informação numérica referente ao índice de massa corpórea, entretanto, todos os prontuários selecionados apresentavam a definição de obesidade. As comorbidades prévias mais prevalentes foram: hipertensão arterial sistêmica (55,5%), cirrose hepática (33,3%) e doença pulmonar obstrutiva crônica (22,2%). Comparando-se os dois grupos, observamos que há predominância de sexo masculino em ambos, entretanto, o grupo A tem uma média de idade superior. As causas de óbito do grupo B variaram, incluindo eventos tromboembólicos, neoplasias metastáticas, infarto agudo do miocárdio e choque séptico.

Quadro 3: Dados Clínicos do Grupo B

	Participante 1	Participante 2	Participante 3
Idade	65 anos	75 anos	79 anos
Sexo	Masculino	Feminino	Feminino
Comorbidades	HAS com tratamento irregular	HAS, ICC (FE 39%)	Câncer de endométrio em tratamento há 3 anos
IMC	Não informa IMC, apenas refere obesidade	Não informa IMC, apenas refere obesidade	Não informa IMC, apenas refere obesidade grau II
	Sem dados	Sem dados	Sem dados
Data de admissão	01/06/2012	29/04/2009	21/05/2007
Data de falecimento	01/06/2012	05/05/2009	23/05/2007
História Clínica	Intubação orotraqueal, RCP por 30 minutos sem retorno a circulação espontânea	IOT na UPA em 28/04 devido a dispnéia progressiva e ortopneia; identificada consolidação em base pulmonar direita; no dia da morte, apresentou 2 PCR, a primeira em FV, com retorno a circulação espontânea após choque.	Dor súbita em perna esquerda associada a náuseas e vômitos; evolui em PCR em taquicardia ventricular; responsiva a medidas iniciais, transferida para UTI com acidose grave, evoluindo a óbito posteriormente
Medicações no internamento	DVA	Ceftriaxona + azitromicina; DVA	Sem dados
Causa da morte	Aneurisma dissecante de aorta roto em segmento abdominal, hemoperitônio e hemomediastino	Trombose venosa profunda + tromboembolismo pulmonar	Adenocarcinoma de endométrio + carcinomatose peritoneal pélvica + metástases pulmonares + Trombose venosa profunda em MIE + tromboembolismo pulmonar
	Participante 4	Participante 5	Participante 6
Idade	59 anos	66 anos	42 anos
Sexo	Masculino	Masculino	Masculino
Comorbidades	Cirrose hepática de etiologia alcoólica Child B	Coronariopatia, DPOC	HAS, dislipidemia, Ex-tabagista,
IMC	Não informa IMC, apenas refere obesidade	Não informa IMC, apenas refere obesidade	Não informa IMC, apenas refere obesidade
Data de admissão	04/09/2004	14/04/2004	12/09/2007
Data de falecimento	05/09/2004	14/04/2004	13/09/2007

História Clínica	Submetido a transplante hepático no dia 05/09, evoluindo com quadro sugestivo de choque hemorrágico, evoluindo com duas paradas cardiorrespiratórias durante laparotomia exploradora	Participante busca UPA com dor precordial, dispneia e tosse produtiva; evoluiu com PCR sendo revertida após 15 minutos. Dá entrada no pronto-atendimento com ECG 3, pupilas midríaticas e não fotorreagentes. Nova PCR em assistolia após admissão, evoluindo a óbito.	Dispneia, tosse e mal-estar geral; evoluiu com crise convulsiva que respondeu a diazepam - na UPA. Encaminhado hospital apresentando quadro de insuficiência respiratória aguda com necessidade de IOT e VM. 2 PCR em AESP totalizando 37 minutos de RCP.
Medicações no internamento	Sem dados	Sem dados	Dopamina
Causa da morte	Hemorragia + enxerto ortotópico de fígado com sinais de necrose	Aterosclerose sistêmica severa + edema agudo grave de pulmão	Infarto agudo no átrio direito + edema agudo de pulmão
	Participante 7	Participante 8	Participante 9
Idade	79 anos	47 anos	52 anos
Sexo	Feminino	Masculino	Masculino
Comorbidades	Hipotireoidismo, HAS, depressão, AVC há 4 anos sem sequelas, nefrectomia há 9 anos por câncer renal,	Leucemia mieloide crônica	Cirrose hepática de etiologia alcoólica Child B
IMC	Não informa IMC, apenas refere obesidade	Não informa IMC, apenas refere obesidade grau III	Não informa IMC, apenas refere obesidade
	Sem dados	Sem dados	Sem dados
Data de admissão	24/06/2007	29/06/2010	13/03/2000
Data de falecimento	02/07/2007	30/06/2010	14/03/2000
História Clínica	Queixa de rebaixamento do nível de consciência há 15 dias, TAC com laudo normal; diagnosticada pneumonia e insuficiência renal secundária a sepse. Apresentou PCR em AESP 2x, sendo reanimada por aproximadamente 40 minutos.	Interna para TMO em 21/05/2010. Evoluiu com dor abdominal e elevação de bilirrubinas. AngioRNM mostrou dilatação de vias biliares com afunilamento abrupto. Evoluiu posteriormente com choque abrupto e óbito.	Submetido a transplante hepático no dia 13/03 evoluindo com coagulopatia e sangramento difuso intra-operatório, que não puderam ser revertidos mesmo com infusão de hemoderivados e manobras de hemostasia. Óbito 7 horas após a cirurgia.
Medicações no internamento	Ceftriaxona e azitromicina.	Sem dados	Sem dados
Causa da morte	Endocardite infecciosa de valvar aórtica + edema agudo de pulmão; presença de trombos em organização em MIE	Leucemia mieloide crônica + doença do enxerto contra hospedeiro gástrica, hepática e intestinal intensa (Grau III)	Hemoperitônio

HAS: hipertensão arterial sistêmica; ICC: insuficiência cardíaca congestiva; FE: fração de ejeção; PCR: parada cardiorrespiratória; RCP: reanimação cardiopulmonar; IOT: intubação orotraqueal. MIE: membro inferior esquerdo; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica. UPA: Unidade de Pronto Atendimento; ECG: Escala de coma de Glasgow; AESP: atividade elétrica sem pulso; AVC: acidente vascular encefálico. TAC: tomografia computadorizada; angioRNM: angioressonância magnética;

4.2. DADOS ESTATÍSTICOS

Foram realizadas as análises estatísticas de imunoexpressão de um total de oito marcadores selecionados para esse projeto: IL-6, IL-8, TNF- α , NALP, IL-18, IL 1 β , GASD-D e HIF. Nos gráficos abaixo apresentados, demonstramos os resultados estatísticos após a análise de imunoexpressão desses oito marcadores nas lâminas de pulmão dos participantes dos grupos A e B.

É possível observar no gráfico 1 que há diferença estatisticamente significativa na imunoexpressão de IL-6 entre o A e B ($p < 0,0001$), com

maior expressão nas lâminas do grupo B. É possível inferir com relação a IL-8 (gráfico 2) e ao TNF- α (gráfico 3) que não há diferença estatisticamente significativa entre o grupo A e B, com $p=0,8291$ e $p=0,2349$, respectivamente.

O gráfico 4 demonstra a expressão do marcador NALP (NLRP3), existindo diferença estatística entre os dois grupos analisados com $p=0,0004$, favorecendo o grupo B. O gráfico 5 analisa a expressão da citocina IL-18; referente a tal, podemos identificar que há maior expressão desse marcador nos participantes do grupo B quando comparado ao grupo A, com $p=0,002$.

No gráfico 6 há representação da imunoexpressão da IL-1 β ; observa-se que não existe diferença significativa entre os dois grupos de participantes obesos, com $p=0,5856$.

O gráfico 7 avalia a imunoexpressão da gasdermina-D, com ausência de diferença significativa entre os dois grupos avaliados ($p=0,3301$). Por fim, o gráfico 8 apresenta os resultados da análise imunohistoquímica do HIF, que evidencia diferença estatisticamente significativa entre grupos A e B, com maior concentração do imunomarcador no grupo B ($p=0,0327$).

Gráfico 1: Análise Estatística de Imunoexpressão da IL-6

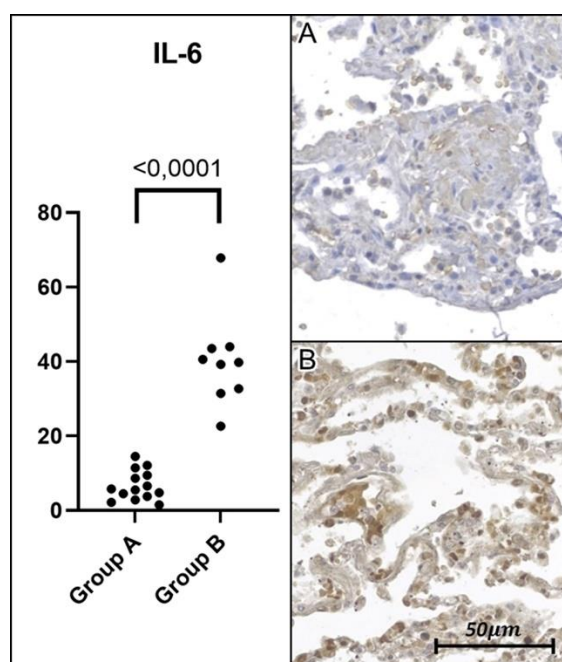


Gráfico 2: Análise Estatística de Imunoexpressão da IL-8

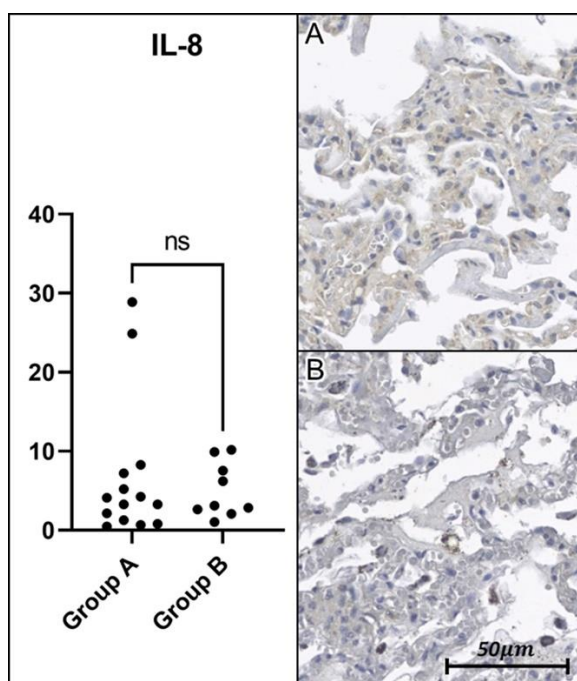


Gráfico 3: Análise Estatística de Imunoexpressão do TNF- α

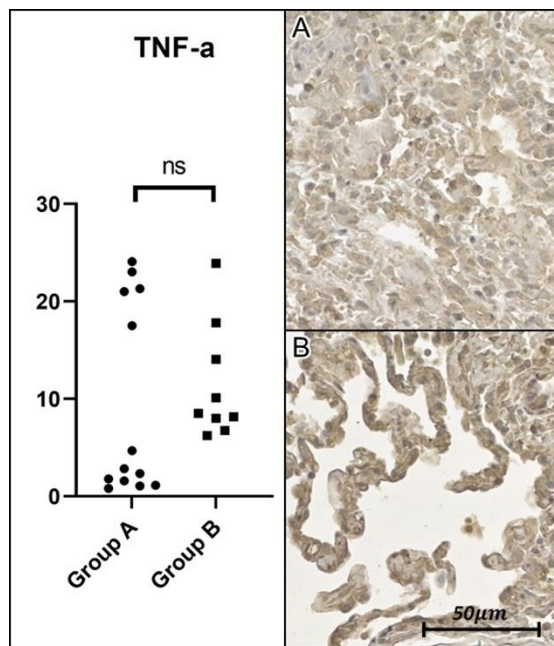


Gráfico 4: Análise Estatística de Imunoexpressão do NALP

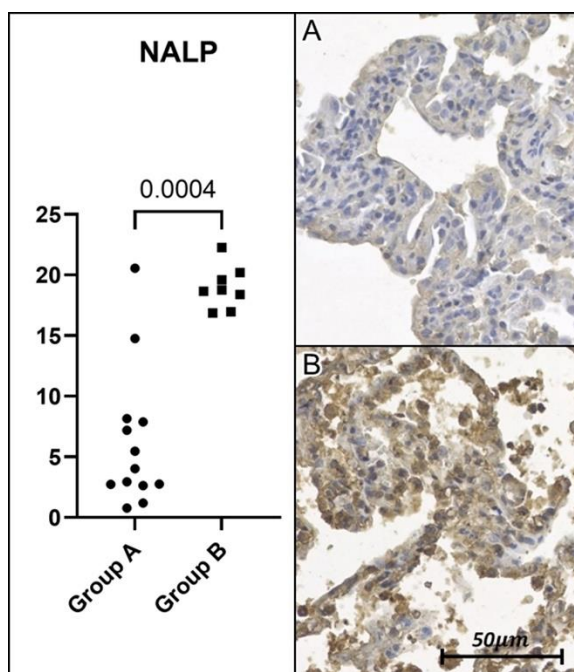


Gráfico 5: Análise Estatística de Imunoexpressão da IL-18

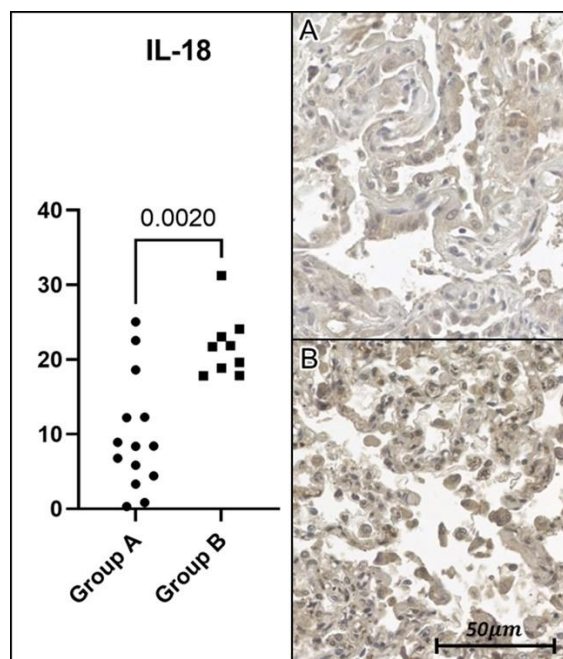


Gráfico 6: Análise Estatística de Imunoexpressão da IL-1 β

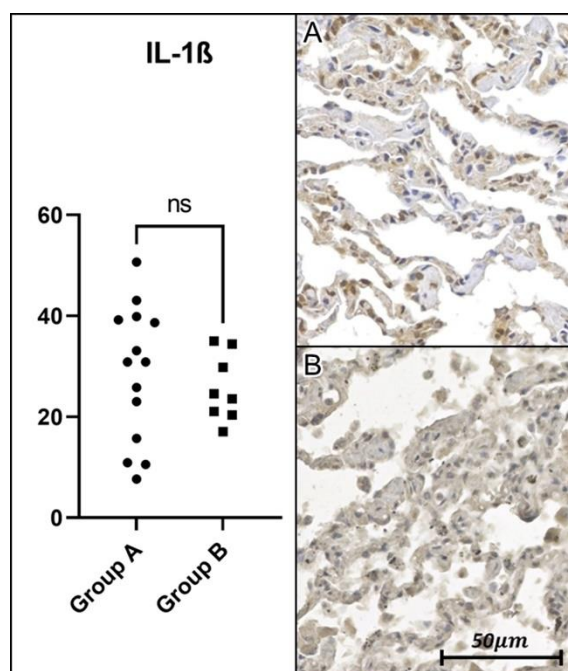


Gráfico 7: Análise Estatística de Imunoexpressão da GASD-D

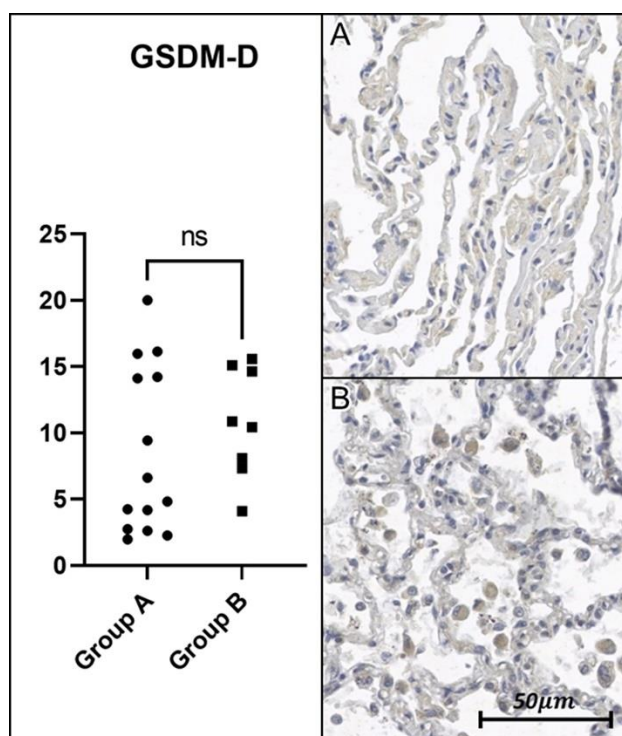
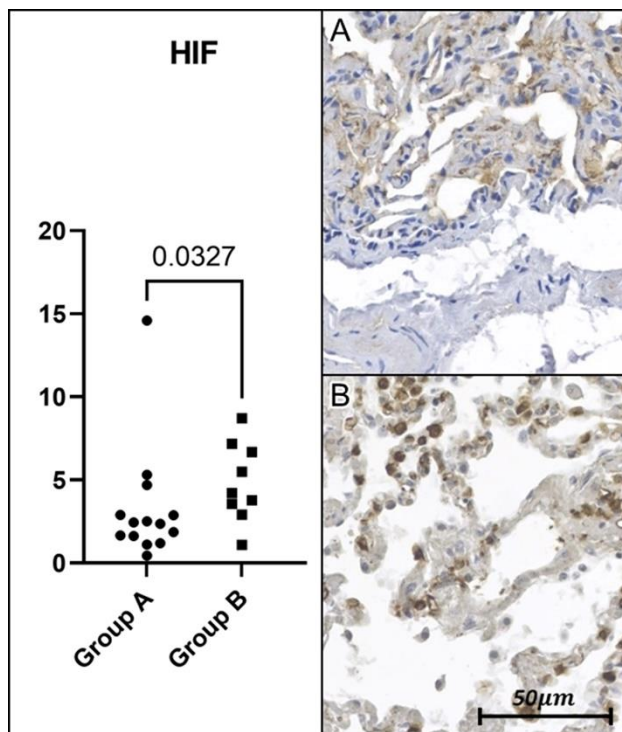


Gráfico 8: Análise Estatística de Imunoexpressão do HIF



5. DISCUSSÃO

A obesidade está diretamente associada a um estado inflamatório crônico, sendo uma das vias pró-inflamatórias mais ativadas a via do inflamassoma NLRP3. (31,32) Muitos artigos recentemente publicados demonstraram que a infecção pelo SARS-CoV-2 também promove a indução dessa via inflamatória. (15,29,30,33)

Com relação as citocinas pró-inflamatórias envolvidas na ativação inicial da montagem do complexo multiproteico do inflamassoma, observamos maiores concentrações de IL-6 no grupo de participantes apenas com obesidade, sem COVID-19 (grupo B). No caso da IL-8 e do TNF- α , não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Tais achados demonstram que a infecção por COVID-19 adicionou significância estatística aos resultados.

Estudo feito por Unamuno *et al* (32) avaliou a expressão de RNA mensageiro de uma série de marcadores envolvidos na ativação do inflamassoma NLRP3 em participantes obesos, obesos com diabetes e não obesos. Nesse estudo, observou-se uma expressão elevada do RNA mensageiro da IL-6 e do TNF- α nos dois grupos de participantes obesos quando comparado ao grupo de participantes não obesos. Assim, demonstrou-se que a obesidade por si só é capaz de promover elevação de tais marcadores, o que poderia justificar em parte os resultados obtidos em nosso estudo, dado que ambos os grupos são compostos por participantes obesos.

Outra maneira de tentar entender os nossos dados, parte do pressuposto de que nenhuma dessas citocinas é específica do processo

inflamatório da COVID-19 e podem estar elevadas em uma série de outras doenças. A interleucina-6, por exemplo, consiste em uma citocina pró-inflamatória bastante inespecífica, isso porque ela é produzida por uma grande quantidade de células, incluindo monócitos, macrófagos, linfócitos e células endoteliais e, portanto, é liberada em diversos tipos de processos inflamatórios. Nos processos infecciosos agudos, como na COVID-19, os macrófagos, mastócitos e monócitos são as principais células envolvidas na sua produção e secreção (7,29,30,47). A grande expressão de receptores de IL-6 (IL-6R) no fígado torna essa substância uma das principais indutoras da produção de proteínas de fase aguda de infecções, como a proteína C reativa (PCR) e o fibrinogênio (48,49). Entretanto, essa interleucina também está envolvida em processos inflamatórios crônicos: estudos já demonstraram o envolvimento dessa citocina com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e o processo de aterosclerose, neoplasias de diversos sítios e doenças autoimunes (48–51). O grupo B do nosso estudo é composto por participantes obesos com diversas doenças graves capazes de resultar em óbito. Sendo assim, tais participantes possuem, além da obesidade, outros gatilhos e mecanismos indutores de processos inflamatórios que poderiam igualar, e até mesmo superar os valores de interleucina-6 encontrados em participantes obesos com COVID-19.

O TNF- α consiste em uma citocina pró-inflamatória que também está envolvida, principalmente, no processo de ativação da via do inflamassoma NLRP3.(7,29,30,47) Entretanto, a ligação dessa molécula a dois diferentes receptores (TNF- α -R1 e TNF- α -R2) desencadeia, pelo menos, quatro diferentes vias de sinalização intracelular, todas de característica pró-

inflamatória. (50) Sendo assim, podemos inferir que, da mesma maneira que a IL-6, o TNF- α consiste em uma citocina inespecífica, secretada por macrófagos e mastócitos, tendo sido encontrada em concentrações elevadas em participantes com infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva e diversos tipos de neoplasia ativa. (50,51) Em nossos dois grupos temos biópsias post-mortem de participantes que vieram a óbito por diversos motivos, com variados processos inflamatórios desencadeados, e que podem justificar uma elevação uniforme do TNF- α nas amostras.

A interleucina-8 consiste em uma citocina pró-inflamatória cuja expressão é primariamente regulada pela via de sinalização intracelular do NF-kB, podendo ser desencadeada por uma série de diferentes mecanismos gatilhos, incluindo a secreção de outras citocinas pró-inflamatórias, estresses metabólicos, incluindo hipóxia, e pela secreção elevada de hormônios esteroides, como o cortisol. (52) Já foi previamente descrita a relação positiva entre a quantidade de tecido adiposo e a concentração elevada de IL-8 e outros marcadores inflamatórios, bem como a redução da concentração desse marcador em pacientes obesos com perda de peso. (53,54) Da mesma maneira, a IL-8 é uma das citocinas inflamatórias envolvidas na inflamação que é induzida pelo vírus SARS-CoV-2, inclusive já foi citada, juntamente com a IL-6, como um possível parâmetro marcador de gravidade da doença. (55,56). Assim como no caso do TNF- α , não encontramos diferença significativa entre os dois grupos estudados, e, possivelmente, a justificativa para esse achado é a mesma usada para os dois marcadores previamente discutidos: a inespecificidade dessa citocina e sua elevação em outros

processos inflamatórios, como neoplasias (52), doenças pulmonares crônicas (57) e doenças cardiovasculares (58).

Em estudo onde foi realizada comparação entre concentrações de marcadores inflamatórios em pacientes com COVID-19 e em pacientes saudáveis sem COVID-19, foi encontrada concentração marcadamente elevada de IL-6 e TNF- α no grupo dos pacientes com COVID-19 em relação ao grupo controle. (59) Em nosso estudo, com grupo controle formado por obesos com outras múltiplas doenças graves, não tivemos evidenciada a mesma diferença estatística, provavelmente devido ao fato de o grupo B não ser composto por indivíduos saudáveis. Em consonância com nossos resultados, demonstrando a inespecificidade da IL-6 e do TNF- α , o artigo escrito por Yang *et al* descreve que se sabe que, apesar de muitos estudos terem demonstrado níveis elevados de IL-6 e TNF- α na COVID-19, as citocinas e seus níveis nessa infecção não são diferentes daquelas encontradas em outras doenças inflamatórias graves, como a sepse. (14) Novamente, em pesquisa realizada pela Universidade de Stanford em que foi proposta a comparação de valores de citocinas em pacientes com COVID-19 moderada, COVID-19 severa, com síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) e sepse de outras etiologias, não foi encontrada diferença estatística na comparação entre nenhum dos grupos com relação a concentrações das principais citocinas envolvidas na resposta inflamatória grave: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18 e TNF- α . O artigo sugere, por fim, que a tempestade de citocinas que é observada na COVID-19 não difere de nenhuma outra encontrada em outras etiologias. (60) Esses achados em conjunto com nosso artigo reforçam, portanto, que a COVID-19 não adicionou relevância estatística na

concentração de citocinas inflamatórias em obesos com COVID-19 quando comparamos a grupo de obesos com outras doenças graves.

Além de realizarmos a análise das citocinas envolvidas na ativação do complexo do inflamassoma, fizemos também a análise da concentração de NALP (ou NLRP3) nas células pulmonares dos pacientes de ambos os grupos. Interessantemente, obtivemos uma proporção significativamente maior da imunoexpressão desse marcador no grupo de obesos sem COVID-19. Uma possível explicação para esse achado é que a análise isolada de NLRP3 indica apenas a presença dessa proteína no interior da célula e não, necessariamente, o complexo do inflamassoma em sua plena forma de ativação e funcionamento; artigo prévio (15), publicado pela nossa equipe de pesquisadores, identificou ausência de diferença estatística na concentração de NALP em células de biópsias pulmonares *post-mortem* de pacientes com COVID-19 e grupo controle composto por pacientes que vieram a óbito por diversos motivos que não COVID-19 e nem outra etiologia que compromettesse o funcionamento pulmonar, entretanto houve diferença significativa na expressão de ASC, outra proteína formadora do complexo do inflamassoma. (15) Idealmente, portanto, precisamos avaliar a imunoexpressão adicional de dois marcadores para determinar a ativação completa do inflamassoma: ASC e CASP-1, cuja avaliação não foi realizada neste trabalho. Em artigo publicado na revista Nature (27), a avaliação da ativação plena da via do inflamassoma em macrófagos infectados por COVID-19 foi quantificada pela imunoexpressão das três proteínas componentes do inflamassoma. Sem dúvidas, é de grande importância aprofundarmos a avaliação desses dois outros marcadores para que possamos

justificar adequadamente os dados estatísticos encontrados em nossa pesquisa.

Em nossa análise também contemplamos a avaliação das duas principais citocinas resultantes da ativação da via do inflamassoma NLRP3: IL-1 β e IL-18. Não foi encontrada diferença significativa entre as concentrações de IL-1 β nos dois grupos, de forma que podemos observar também que a infecção pela COVID-19 não adicionou significância estatística à imunoexpressão desse marcador. Entretanto, diferentemente das citocinas previamente citadas (IL-6, TNF- α e IL-8), esse marcador parece estar intimamente associado ao processo inflamatório da obesidade, pois, em modelos animais, foi identificada que a expressão do RNA mensageiro da IL-1 β está diretamente relacionada com o tecido adiposo visceral e com o peso corporal. Esse mesmo estudo identificou que ratos alimentados com dietas com alto teor de gordura apresentam maior ativação de caspase-1 e produção elevada de IL-1 β . (31) Um segundo estudo clínico, previamente já citado, demonstrou níveis elevados de expressão de RNA mensageiro de caspase-1 e IL-1 β em pacientes isoladamente obesos e obesos diabéticos em comparação com pacientes eutróficos. Em adição, identificou-se que a perda de peso promove uma redução expressiva na ativação dos genes da CASP-1 e da IL-1 β . (17)

A interleucina-18 é outra citocina pró-inflamatória derivada da ativação canônica do inflamassoma NLRP3. Nossos dados estatísticos revelaram maior imunoexpressão desse marcador nos pacientes obesos do grupo B quando comparado ao grupo A, achado que parece demonstrar, mais

uma vez, que a COVID-19 não só não adicionou significância estatística a produção dessa citocina, como induziu uma menor concentração desse marcador quando comparada a outras doenças graves em obesos. A IL-18 é uma citocina cuja produção é marcadamente elevada com a ativação da caspase-1, porém, possui outras vias capazes de induzirem sua secreção, incluindo aquelas dependentes das enzimas caspase 3 e 4. É uma citocina que tem sido fortemente relacionada com processos inflamatórios crônicos de longa duração. (61) Podemos entender que o grupo B é composto por pacientes com doenças de base graves e com maior tempo de duração que o grupo A, que acabaram por evoluir, em determinada instância, para óbito. Os pacientes do grupo A, em geral, apresentaram-se com comorbidades de base mais controladas e menos graves. Sendo assim, poderíamos considerar que o grupo de obesos sem COVID-19 é mais cronicamente inflamado, o que talvez possa explicar parcialmente os resultados encontrados.

Outra consideração importante a ser feita é que a IL-18, assim como a IL-1 β , também tem sido diretamente relacionada a obesidade. Vandanmagsar *et al* demonstraram que ratos alimentados com dietas ricas em gordura/obesos apresentaram concentrações plasmáticas consideravelmente maiores dessa citocina do que ratos eutróficos, complementando que a ablação dos genes responsáveis pela produção da proteína NLRP3 causou diminuição da expressão da IL-18. (31) Outro estudo demonstrou uma elevação plasmática de IL-18 em pacientes obesos com distúrbios glicêmicos quando comparado a um grupo de pacientes saudáveis eutróficos, além de identificar uma relação positiva entre o aumento do IMC e a concentração sérica dessa citocina. (62) Entretanto, mais recentemente, alguns poucos

estudos tem relacionado a secreção dessa citocina mais ao inflamassoma NLRP1 do que o NLRP3, com evidências de que a IL-18 teria efeitos protetores contra a obesidade e contra síndrome metabólica, dado que ratos com deleção do gene do inflamassoma NLRP1 apresentaram queda da concentração de IL-18 e evoluíram com ganho de peso, enquanto a ativação desse gene promoveu aumento da produção da interleucina-18 prevenindo obesidade. (63,64) Portanto, há clara discordância na literatura sobre a real associação entre a IL-18 e a obesidade, sendo necessários estudos, especialmente revisões sistemáticas e metanálises, que sejam capazes de confirmar tais dados.

Relativo a ativação completa do complexo multiproteico do inflamassoma e a produção de gasdermina-D, encontramos na literatura dados de uma pesquisa referentes a análises histológicas de monócitos infectados com COVID-19. Esse artigo demonstrou uma grande expressão de NALP, ASC e CASP-1, bem como uma recolocação da gasdermina na membrana celular de tais células, sugerindo uma ativa formação de poros de gasdermina. (30) Rodrigues *et al* (33) demonstraram a presença de complexos ativos de inflamassoma em células pulmonares de biópsias *post-mortem* de pacientes com COVID-19, além de sugerir, em seu estudo, que o desfecho mais grave da doença está associado a ativação desse mecanismo inflamatório. Da mesma maneira, S. Toldo *et al* (65) identificaram a expressão de inflamassoma em leucócitos em pulmões de pacientes com COVID-19, além de determinar que a concentração de tais complexos inflamatórios é muito maior em pacientes com COVID-19 fatal do que aquele encontrado em pacientes do grupo controle ($p = 0.00064$). Uma coorte retrospectiva

determinou que pacientes com COVID-19 grave apresentaram valores séricos elevados de gasdermina, de forma que a gravidade da doença se mostrou diretamente relacionada a concentração sérica de tal marcador. Outras várias citocinas foram avaliadas, incluindo TNF- α e IL-18, sem diferença estatística. (66)

Levando em conta os resultados dos estudos anteriores, esperávamos diferença estatística na imunoexpressão da gasdermina-D entre os dois grupos avaliados em nossa pesquisa, entretanto, novamente, não encontramos. Resultados similares foram observados em estudo realizado por Adamik *et al* em 45 pacientes com COVID-19 que deram entrada na UTI, em comparação com 10 pacientes que deram entrada por lesão cerebral sem nenhum sinal de infecção: não foi encontrada nenhuma diferença estatística nos níveis plasmáticos de uma série de citocinas e marcadores correlacionados com o inflamassoma: IL-1 β , IL-18, gasdermina-D e proteína ASC. Em segunda análise, compararam os níveis dos mesmos marcadores entre os pacientes com COVID-19 que vieram a óbito e aqueles que sobreviveram, novamente, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas. (67)

Relativo ao HIF-1 α , considerado atualmente como possível modulador na ativação da via do inflamassoma NLRP3, um estudo que realizou sequenciamento de todo o genoma de monócitos coletados do sangue periférico de pacientes com COVID-19 e pessoas saudáveis sem COVID-19 identificou que as vias de sinalização mais ativadas consistiram nas seguintes: TNF- α , NF- κ B e HIF-1 α ; o estudo demonstrou que a via do fator hipóxia-induzível encontra-se importantemente ativada em pacientes com COVID-19, especialmente naqueles mais idosos, e sua ativação está diretamente

associada a uma importante indução da produção de citocinas pró-inflamatórias. (59) Em nosso presente estudo, porém, houve maior imunoexpressão de HIF no grupo de obesos sem COVID-19. Essencialmente, devido a existência de dois diferentes mecanismos, um crônico e outro agudo, para hipóxia, era esperada uma maior imunoexpressão do HIF-1 α no grupo A quando comparado ao grupo B. Parcialmente, podemos justificar a diferença entre os grupos favorecendo o grupo de obesos sem COVID-19 pela presença, também, de condições patológicas indutoras de isquemia e hipóxia tecidual no grupo B, capazes de ativar a via de transcrição genética do HIF-1 α . Por exemplo, há expressão marcadamente elevada do HIF-1 α e também da via do inflamassoma em pacientes com acidente isquêmico cerebral (44); há ativação de múltiplos genes hipóxia-induzidos pelo HIF em diversos tipos de câncer (68,69) e já foi considerado o uso de HIF como marcador de hipóxia e gravidade em pacientes portadores de eventos tromboembólicos pulmonares. (70) Mas, sem dúvidas, faz-se necessário mais dados e pesquisas que justifiquem esses achados e consigam estipular a real função do HIF-1 α como mediador da via do inflamassoma.

Por fim, nosso estudo não conseguiu comprovar que a infecção pelo SARS-CoV-2 agregou qualquer tipo de significância estatística para o processo inflamatório no paciente obeso, tanto com relação a imunoexpressão de citocinas, quanto com relação a ativação da via do inflamassoma quando comparado a qualquer outro tipo de doença ou comorbidade grave capaz de induzir o óbito. Nossos dados não são isolados na literatura: da mesma forma, ter Ellen *et al* demonstrou em seu estudo que a disfunção endotelial encontrada em pacientes obesos com COVID-19 não parece estar relacionada

a elevação de adipocinas como a leptina, sugerindo que outros mecanismos de lesão endotelial em pacientes obesos com COVID-19 devem ser estudados, especialmente na tentativa de justificar se a obesidade de fato se associa a severidade da doença desses pacientes. (71)

6. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

As duas principais limitações desse estudo são a pequena amostragem de pacientes e a análise feita a partir de biópsias *post-mortem*. A pequena amostra de pacientes do grupo COVID-19 deve-se principalmente ao fato de que o estudo foi realizado no momento em que ocorria uma pandemia global em que houve grande dificuldade de contato com as famílias para autorização para o procedimento de biópsia, tempo limitado para coleta das amostras (até 4 horas após o óbito) associado ao profundo luto e pesar dos familiares com relação as perdas.

As amostras de biópsia *post-mortem* permitem inferir, apenas, informações relativas ao momento em que houve o óbito do paciente. Não há possibilidade de avaliar variações de concentrações de marcadores ou sua evolução ao longo do período.

7. CONCLUSÃO E ETAPAS FUTURAS

Em conclusão, fomos capazes de descrever, conforme proposto inicialmente, a ativação da via do inflamassoma NLRP3 e a resposta inflamatória existente em pacientes obesos que vieram a óbito por COVID-19, bem como comparar o padrão de ativação e resposta inflamatória com o grupo controle. Os resultados obtidos estabeleceram que a existência de

infecção por SARS-CoV-2 em um paciente obeso é tão indutora de inflamação quanto qualquer outra doença capaz de induzir o óbito, como doenças cardiovasculares, neoplasias avançadas e sepses bacterianas. A literatura muito tem relacionado a COVID-19 a uma grave tempestade de citocinas capaz de induzir lesão endotelial generalizada e disfunção de múltiplos órgãos, entretanto, pelos dados até aqui encontrados, a tempestade de citocinas e a ativação da via do inflamassoma nessa doença ocorre em parâmetros muito similares ao que vemos em outras graves patologias. Não pudemos, com os dados até aqui disponíveis, determinar claramente a ação do HIF-1 α como modulador da ativação do inflamassoma.

Restam muitas perguntas a serem respondidas e, talvez, esse projeto de pesquisa tenha trazido mais questionamentos do que respostas propriamente ditas. Para que possamos determinar com maior precisão sobre a ativação plena do complexo multiproteico do inflamassoma, precisamos avaliar alguns marcadores complementares, como o ASC, a CASP-1 e a CASP-9 (com objetivo de controle negativo). A avaliação isolada do NALP (ou NLRP3) não é capaz de trazer uma avaliação confiável e completa acerca da ativação plena do complexo multiproteico, orientando, apenas, a existência dessa proteína no meio intracelular. A avaliação conjunta dos três componentes do inflamassoma oferecerá uma maior confiabilidade aos resultados. Pode ser válida, em etapa futura, a avaliação da imunoexpressão do NF- κ B, molécula de transcrição gênica responsável pelo desencadeamento da produção e montagem do inflamassoma em sua forma final.

A proposta desse mestrado em avaliar o padrão de acometimento inflamatório da população obesa em uma pandemia é de grande importância

para a saúde pública mundial, levando-se em consideração que a obesidade é uma doença extremamente prevalente na atualidade e traz consigo uma série de complicações e desfechos ainda pendentes de esclarecimentos. A continuidade dessa pesquisa em um doutorado, com análise complementar de novos imunomarcadores, pode trazer mais esclarecimentos e resultados que auxiliem, de alguma maneira, a compreender a inflamação na obesidade e sua relação com doenças graves e de cunho mundial, como a COVID-19.

8. REFERÊNCIAS

1. Kwaifa IK, Bahari H, Yong YK, Md Noor S. Endothelial dysfunction in obesity-induced inflammation: Molecular mechanisms and clinical implications. *Biomolecules*. 2020;10(2).
2. Caballero B. Humans against Obesity: Who Will Win? [Internet]. Vol. 10, *Advances in Nutrition*. 2019. p. S4–9. Available from: https://academic.oup.com/advances/article/10/suppl_1/S4/5307222
3. Viridis A. Endothelial Dysfunction in Obesity: Role of Inflammation. *High Blood Press Cardiovasc Prev*. 2016;23(2):83–5.
4. Popkin BM, Du S, Green WD, Beck MA, Algaith T, Herbst CH, et al. Individuals with obesity and COVID-19: A global perspective on the epidemiology and biological relationships. *Obes Rev*. 2020;21(11):1–17.
5. De Lima JC, Moura-Assis A, Cintra RM, Quinaglia T, Velloso LA, Sposito AC. Central role of obesity in endothelial cell dysfunction and cardiovascular risk. *Rev Assoc Med Bras*. 2019;65(1):87–97.
6. Viridis A, Masi S, Colucci R, Chiriaco M, Uliana M, Puxeddu I, et al. Microvascular

- Endothelial Dysfunction in Patients with Obesity [Internet]. Vol. 21, Current Hypertension Reports. 2019 Apr. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11906-019-0930-2>
7. De Lorenzo A, Estado V, Castro-Faria-Neto HC, Tibirica E. Obesity-Related Inflammation and Endothelial Dysfunction in COVID-19: Impact on Disease Severity. *J Inflamm Res* [Internet]. 2021 May;Volume 14:2267–76. Available from: <https://www.dovepress.com/obesity-related-inflammation-and-endothelial-dysfunction-in-covid-19-i-peer-reviewed-fulltext-article-JIR>
 8. Mancuso P. Obesity and lung inflammation. *J Appl Physiol*. 2010;108(3):722–8.
 9. Jung SH, Kwon JM, Shim JW, Kim DS, Jung HL, Park MS, et al. Effects of diet-induced mild obesity on airway hyperreactivity and lung inflammation in mice. *Yonsei Med J*. 2013;54(6):1430–7.
 10. Lessard A, Alméras N, Turcotte H, Tremblay A, Després JP, Boulet LP. Adiposity and pulmonary function: Relationship with body fat distribution and systemic inflammation. *Clin Investig Med*. 2011;34(2):64–70.
 11. Korakas E, Ikonomidis I, Kousathana F, Balampanis K, Kountouri A, Raptis A, et al. Obesity and COVID-19: Immune and metabolic derangement as a possible link to adverse clinical outcomes. Vol. 319, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2020. p. E105–9.
 12. Sanchis-Gomar F, Lavie CJ, Mehra MR, Henry BM, Lippi G. Obesity and Outcomes in COVID-19: When an Epidemic and Pandemic Collide. *Mayo Clin Proc*. 2020;95(7):1445–53.
 13. Gao M, Piernas C, Astbury NM, Hippisley-Cox J, O’Rahilly S, Aveyard P, et al.

- Associations between body-mass index and COVID-19 severity in 6·9 million people in England: a prospective, community-based, cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol* [Internet]. 2021;9(6):350–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587\(21\)00089-9](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587(21)00089-9)
14. Wanqi Yu, Kristen E. Rohli, Shujuan Yang PJ. Impact of obesity on COVID-19 patients. *J Diabetes Complications*. 2021;35(January):293.
 15. Baena Carstens L, Campos D'amico R, Fernandes de Moura K, Morais de Castro E, Centenaro F, Silva Barbosa G, et al. Lung Inflammasome Activation in SARS-CoV-2 Post-Mortem Biopsies. *Int J Mol Sci*. 2022;23(21):13033.
 16. Dragon-Durey MA, Chen X, Kirilovsky A, Hamouda N Ben, Sissy C El, Russick J, et al. Differential association between inflammatory cytokines and multiorgan dysfunction in COVID-19 patients with obesity. Vol. 16, *PLoS ONE*. 2021.
 17. Huang Y, Lu Y, Huang Y-M, Wang M, Ling W, Sui Y, et al. Obesity in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Metabolism* [Internet]. 2020 Dec;113(January):154378. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049520302420>
 18. Aghili SMM, Ebrahimpur M, Arjmand B, Shadman Z, Pejman Sani M, Qorbani M, et al. Obesity in COVID-19 era, implications for mechanisms, comorbidities, and prognosis: a review and meta-analysis. *Int J Obes* [Internet]. 2021;45(5):998–1016. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41366-021-00776-8>
 19. Minuzzi LG, Seelaender M, Silva BSDA, Cunha E del BB, Deus MDC, Vasconcellos FTF, et al. COVID-19 Outcome Relates With Circulating BDNF, According to Patient Adiposity and Age. *Front Nutr*. 2021;8(December):1–15.

20. Ribeiro dos Santos Miggiolaro AF, da Silva Motta Junior J, Busatta Vaz de Paula C, Nagashima S, Alessandra Scaranello Malaquias M, Baena Carstens L, et al. Covid-19 cytokine storm in pulmonary tissue: Anatomopathological and immunohistochemical findings. *Respir Med Case Reports* [Internet]. 2020;31:101292. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rmcr.2020.101292>
21. Mulay A, Konda B, Garcia G, Yao C, Beil S, Villalba JM, et al. SARS-CoV-2 infection of primary human lung epithelium for COVID-19 modeling and drug discovery. *Cell Rep* [Internet]. 2021 May;35(5):109055. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124721003715>
22. Bottino E, Ponce AA. Respuesta inmunitaria innata pulmonar en la infección por Sars-Cov-2. *Rev Fac Cienc Med Cordoba*. 2022;79(1):33–42.
23. Budinger GRS, Misharin A V., Ridge KM, Singer BD, Wunderink RG. Distinctive features of severe SARS-CoV-2 pneumonia. *J Clin Invest*. 2021;131(14):1–12.
24. Miggiolaro AFRS, da Silva FPG, Wiedmer DB, Godoy TM, Borges NH, Piper GW, et al. COVID-19 and Pulmonary Angiogenesis: The Possible Role of Hypoxia and Hyperinflammation in the Overexpression of Proteins Involved in Alveolar Vascular Dysfunction. *Viruses*. 2023;15(3):706.
25. Filograna L, Grassi S, Manenti G, Di Donna C, Tatulli D, Nardoni F, et al. Postmortem CT pulmonary findings in SARS-CoV-2-positive cases: correlation with lung histopathological findings and autopsy results. *Int J Legal Med* [Internet]. 2022;136(5):1407–15. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00414-022-02793-2>
26. Xia M, Boini KM, Abais JM, Xu M, Zhang Y, Li PL. Endothelial NLRP3 inflammasome activation and enhanced neointima formation in mice by adipokine visfatin. *Am J Pathol* [Internet]. 2014;184(5):1617–28. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.01.032>

27. Sefik E, Qu R, Junqueira C, Kaffe E, Mirza H, Zhao J, et al. Inflammasome activation in infected macrophages drives COVID-19 pathology. *Nature*. 2022;606(7914):585–93.
28. Yap JKY, Moriyama M, Iwasaki A. Inflammasomes and Pyroptosis as Therapeutic Targets for COVID-19. Vol. 205, *The Journal of Immunology*. 2020. p. 307–12.
29. López-Reyes A, Martínez-Armenta C, Espinosa-Velázquez R, Vázquez-Cárdenas P, Cruz-Ramos M, Palacios-Gonzalez B, et al. NLRP3 Inflammasome: The Stormy Link Between Obesity and COVID-19. *Front Immunol*. 2020;11(October):1–9.
30. Vora SM, Lieberman J, Wu H. Inflammasome activation at the crux of severe COVID-19. *Nature Reviews Immunology*. 2021.
31. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med*. 2011;17(2):179–89.
32. Unamuno X, Gómez-Ambrosi J, Ramírez B, Rodríguez A, Becerril S, Valentí V, et al. NLRP3 inflammasome blockade reduces adipose tissue inflammation and extracellular matrix remodeling. *Cell Mol Immunol*. 2021;18(4):1045–57.
33. Rodrigues TS, de Sá KSG, Ishimoto AY, Becerra A, Oliveira S, Almeida L, et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *J Exp Med* [Internet]. 2021 Mar 1;218(3). Available from: <https://rupress.org/jem/article/218/3/e20201707/211560/Inflammasomes-are-activated-in-response-to-SARS>

34. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 β (IL-1 β) processing pathway. *Sci Signal*. 2010;3(105):2–4.
35. Sharma BR, Kanneganti TD. NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases. *Nat Immunol*. 2021;22(5):550–9.
36. Solini A, Menini S, Rossi C, Ricci C, Santini E, Blasetti Fantauzzi C, et al. The purinergic 2X7 receptor participates in renal inflammation and injury induced by high-fat diet: Possible role of NLRP3 inflammasome activation. *J Pathol*. 2013;231(3):342–53.
37. Theodorou K, Boon RA. Endothelial cell metabolism in atherosclerosis. *Front Cell Dev Biol*. 2018;6(AUG):1–9.
38. He WT, Wan H, Hu L, Chen P, Wang X, Huang Z, et al. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. *Cell Res*. 2015;25(12):1285–98.
39. Nagashima S, Mendes MC, Camargo Martins AP, Borges NH, Godoy TM, Miggiolaro AFRDS, et al. Endothelial dysfunction and thrombosis in patients with COVID-19 - Brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;(October):2404–7.
40. Gedefaw L, Ullah S, Leung PHM, Cai Y, Yip SP, Huang CL. Inflammasome activation-induced hypercoagulopathy: Impact on cardiovascular dysfunction triggered in covid-19 patients. *Cells*. 2021;10(4).
41. AbdelMassih A, Yacoub E, Hussein RJ, Kamel A, Hozaien R, El Shershaby M, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF): The link between obesity and COVID-19. *Obes Med* [Internet]. 2021;22(December 2020):100317. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.obmed.2020.100317>

42. Lee YS, Kim JW, Osborne O, Oh DY, Sasik R, Schenk S, et al. Increased adipocyte O₂ consumption triggers HIF-1 α , causing inflammation and insulin resistance in obesity. *Cell* [Internet]. 2014;157(6):1339–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.012>
43. Engin AB, Engin A. Obesity and Lipotoxicity. 2017;960. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-48382-5>
44. Jiang Q, Geng X, Warren J, Eugene Paul Cosky E, Kaura S, Stone C, et al. Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) Mediates NLRP3 Inflammasome-Dependent-Pyrototic and Apoptotic Cell Death Following Ischemic Stroke. *Neuroscience* [Internet]. 2020;448:126–39. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.09.036>
45. Jahani M, Dokaneheifard S, Mansouri K. Hypoxia: A key feature of COVID-19 launching activation of HIF-1 and cytokine storm. Vol. 17, *Journal of Inflammation* (United Kingdom). 2020.
46. Serebrovska ZO, Chong EY, Serebrovska T V., Tumanovska L V., Xi L. Hypoxia, HIF-1 α , and COVID-19: from pathogenic factors to potential therapeutic targets. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2020;41(12):1539–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41401-020-00554-8>
47. Motta Junior J da S, Miggiolaro AFR dos S, Nagashima S, de Paula CBV, Baena CP, Scharfstein J, et al. Mast Cells in Alveolar Septa of COVID-19 Patients: A Pathogenic Pathway That May Link Interstitial Edema to Immunothrombosis. *Front Immunol*. 2020;11(September).
48. Yao X, Huang J, Zhong H, Shen N, Faggioni R, Fung M, et al. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. *Pharmacol Ther* [Internet].

- 2014;141(2):125–39. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.09.004>
49. Ridker PM, Rane M. Interleukin-6 Signaling and Anti-Interleukin-6 Therapeutics in Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 2021;128(11):1728–46.
 50. Landskron G, De La Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res.* 2014;2014.
 51. Goswami SK, Ranjan P, Dutta RK, Verma SK. Management of inflammation in cardiovascular diseases. *Pharmacol Res.* 2021;173:1–34.
 52. Waugh DJJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(21):6735–41.
 53. Starr KNP, Orenduff M, McDonald SR, Mulder H, Sloane R, Pieper CF, et al. Influence of Weight Reduction on Biomarkers of Inflammation in Older Adults with Obesity. *J Nutr Gerontol Geriatr.* 2020;38(1):33–49.
 54. Al-sharif FM, El-kader SMA, Neamatallah ZA, Alkhateeb AM, Abdulaziz K. Weight reduction improves immune system and inflammatory cytokines in obese asthmatic patients. *Afr Health Sci.* 2020;20(2):897–902.
 55. Patterson BK, Guevara-Coto J, Yogendra R, Francisco EB, Long E, Pise A, et al. Immune-Based Prediction of COVID-19 Severity and Chronicity Decoded Using Machine Learning. *Front Immunol.* 2021;12(June):1–13.
 56. Hasanvand A. COVID-19 and the role of cytokines in this disease. *Inflammopharmacology* [Internet]. 2022;30(3):789–98. Available from:
<https://doi.org/10.1007/s10787-022-00992-2>

57. Che L, Yu C, Chen G, Lin J, Xie Z, Xia T, et al. The inflammatory response induced by relm β upregulates il-8 and il-1 β expression in bronchial epithelial cells in copd. *Int J COPD*. 2021;16(May):2503–13.
58. Apostolakis S, Vogiatzi K, Amanatidou V, Spandidos DA. Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2009;84(3):353–60.
59. Tian M, Liu W, Li X, Zhao P, Shereen MA, Zhu C, et al. HIF-1 α promotes SARS-CoV-2 infection and aggravates inflammatory responses to COVID-19. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2021;6(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-021-00726-w>
60. Wilson JG, Simpson LJ, Ferreira AM, Rustagi A, Roque J, Asuni A, et al. Cytokine profile in plasma of severe COVID-19 does not differ from ARDS and sepsis. *JCI Insight*. 2020;5(17):1–6.
61. McInnes IB, Gracie JA, Leung BP, Wei XQ, Liew FY. Interleukin 18: A pleiotropic participant in chronic inflammation. *Immunol Today*. 2000;21(7):312–5.
62. Nedeva I, Gateva A, Assyov Y, Karamfilova V, Hristova J, Yamanishi K, et al. IL-18 Serum Level in Subjects with Obesity, Prediabetes, and Newly Identified Type 2 Diabetes. *Iran J Immunol*. 2022;19(2):193–200.
63. Hildebrandt X, Ibrahim M, Peltzer N. Cell death and inflammation during obesity: “Know my methods, WAT(son).” *Cell Death Differ*. 2022;(September 2022).
64. Murphy AJ, Kraakman MJ, Kammoun HL, Dragoljevic D, Lee MKS, Lawlor KE, et al. IL-18 Production from the NLRP1 Inflammasome Prevents Obesity and Metabolic Syndrome. *Cell Metab* [Internet]. 2016;23(1):155–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.024>

65. Toldo S, Bussani R, Nuzzi V, Bonaventura A, Mauro AG, Cannatà A, et al. Inflammasome formation in the lungs of patients with fatal COVID-19. *Inflamm Res* [Internet]. 2021;70(1):7–10. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00011-020-01413-2>
66. Suzuki S, Imamura M, Mouri M, Tsuchida T, Tomita H, Matsuoka S, et al. Serum gasdermin D levels are associated with the chest computed tomography findings and severity of COVID-19. *Respir Investig* [Internet]. 2022;60(6):750–61. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.resinv.2022.06.007>
67. Adamik B, Ambrożek-Latecka M, Dragan B, Jeznach A, Śmiechowiec J, Goździk W, et al. Inflammasome-related Markers upon ICU Admission do not Correlate with Outcome in Critically Ill COVID-19 Patients. *Shock*. 2022;57(5):672–9.
68. Korbecki J, Simińska D, Gąssowska-Dobrowolska M, Listos J, Gutowska I, Chlubek D, et al. Chronic and cycling hypoxia: Drivers of cancer chronic inflammation through hif-1 and nf-kb activation. A review of the molecular mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2021;22(19):1–26.
69. Wicks EE, Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: cancer progression and clinical translation. *J Clin Invest*. 2022;132(11):1–10.
70. Kerget B, Afşin DE, Aksakal A, Aşkin S, Araz Ö. Could HIF-1 α be a novel biomarker for the clinical course and treatment of pulmonary embolism? *Turkish J Med Sci*. 2020;50(4):963–8.
71. ter Ellen BM, Niewold J, Flikweert A, Muller Kobold AC, Heeringa P, van Meurs M, et al. Mediators of Obesity Do Not Influence SARS-CoV-2 Infection or Activation of Primary Human Lung Microvascular Endothelial Cells In Vitro. *Front Immunol*. 2022;13(June):1–11.

9. ANEXOS

9.1. ANEXO 1: PARECER DA COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: COVID19

Caracterização clínica e epidemiológica de pacientes atendidos em Curitiba-PR

Pesquisador: Cristina Pellegrino Baena

Área Temática: A critério do CEP

Versão: 1

CAAE: 30188020.7.1001.0020

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica do Parana - PUCPR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.944.734

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram encontrados óbices éticos nos documentos do protocolo.

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

BRASILIA, 31 de Março de 2020

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador(a))

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

9.2. ANEXO 2: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de consentimento livre e esclarecido

Post-Mortem

O objetivo deste estudo é descrever sinais, sintomas, e demais aspectos da apresentação do quadro clínico, exames laboratoriais, evolução da doença, juntamente com alterações da pulmonares em pacientes com COVID-19.

O vírus SARS-CoV-2 emergiu no último bimestre de 2019, em que a doença provocada por este microrganismo foi reportada inicialmente na China, espalhando-se rapidamente pelos continentes, até que em 11 de março de 2020, a Organização Mundial de Saúde decretou estado de pandemia. O surto foi identificado como uma série de casos de pneumonia em que muitos pacientes evoluíram para insuficiência respiratória e óbito.

Embora existam muitos estudos em andamento para busca de tratamento e vacina, ainda não existe evidência definitiva de cura para toda a população.

PROCEDIMENTOS:

1. Biópsia minimamente invasiva de fragmento pulmonar (dimensões de 3x3 cm), através de incisão com corte sobre a pele com comprimento entre 5 e 10 cm, em face anterior de tórax (peito) à esquerda.
2. Biópsia minimamente invasiva de fragmento de miocárdio (músculo do coração), com dimensões de 1x1 cm, quando acessível pela mesma abertura no tórax.
3. Biópsia minimamente invasiva de fragmento de músculo esquelético intercostal, com dimensões de 1x1 cm, quando acessível pela mesma abertura no tórax.

4. Biópsia de rim minimamente invasiva, guiada por Ultrassom, com punção por agulha para tecidos, com fragmentos de aproximadamente 10 a 20 mm.
5. Biópsia de fígado minimamente invasiva, guiada por Ultrassom, com punção por agulha para tecidos, com fragmentos de aproximadamente 10 a 20 mm.

ANÁLISES:

A partir dos fragmentos de pulmão, coração, rim, músculo esquelético e fígado (quando coletados) serão realizados preparos em formato de lâminas para estudo de células, proteínas, anticorpos, presença do vírus, estudos genéticos e imunológicos.

RISCOS:

Não há existência de qualquer risco biológico ao doador ou familiares em decorrência dos procedimentos a serem realizadas pela pesquisa.

BENEFÍCIOS:

A autorização de coleta destas amostras de sangue e tecido pelos familiares do doador trazem como benefício a possibilidade de execução de estudos em busca de compreensão da nova doença provocada pelo vírus SARS-CoV2, além de contribuição para o desenvolvimento de linhas de tratamento e prevenção, como descrito acima.

SIGILO E PRIVACIDADE:

Estou ciente de minha privacidade respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma me identificar será mantido em sigilo. Os

pesquisadores se responsabilizam pela guarda e confidencialidade dos dados, bem como a não exposição dos dados de pesquisa.

RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO:

Todas as despesas serão de responsabilidade dos Pesquisadores. Os participantes da pesquisa bem como seu acompanhante (se houver) não arcarão com nenhum custo referente a procedimento, exames, transporte, alimentação ou outros. Caso ocorra qualquer despesa, haverá ressarcimento dos valores gastos na forma seguinte: depósito em conta. Caso ocorra algum dano decorrente da minha da minha participação no estudo, serei devidamente indenizado.

CONTATO

Os pesquisadores envolvidos com o estudo são Juliano Gasparetto, Cristina Baena, Anna Flavia Miggiolaro, Felipe Tuon, Andrea Moreno, Lucia Noronha, Thyago Moraes, Lidia Moura, José Faria, Gustavo Lenci, que são pesquisadores e professores na Escola de Medicina da PUCPR e com eles poderei manter contato pelos telefones (41)3271-2979. O Conselho Nacional de Pesquisa (CONEP) é composto por um grupo de pessoas que estão trabalhando para garantir que seus direitos como participante de pesquisa sejam respeitados. Ele tem a obrigação de avaliar se a pesquisa foi planejada e se está sendo executada de forma ética. Se você achar que a pesquisa não está sendo realizada da forma como você imaginou ou que está sendo prejudicado de alguma forma, você pode entrar em contato com o CONEP pelo telefone (61)3315-5877 entre segunda e sexta-feira das 08h às 18h ou pelo e-mail conep@saude.gov.br Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, Lote D 3º andar Brasília.

Por meio deste instrumento eu _____
(nome completo), _____ (grau de parentesco com o
paciente), RG _____ autorizo a biópsia post-mortem do paciente
após seu óbito para fins de determinação da causa de morte, doenças primárias, doenças não
diagnosticadas e relacionar com a suspeita de infecção por Coronavírus (COVID-19).

Nome do paciente: _____

Data de óbito: ____/____/____ Hora de óbito: _____

Hospital em que ocorreu o óbito: _____

Declaro estar ciente que:

- O procedimento implica na retirada de amostras de órgãos do paciente de maneira minimamente invasiva.
- As amostras retiradas serão mantidas e acondicionadas respeitando o sigilo médico-paciente assim como as normas e padrões de confidencialidade e ética aplicadas a pesquisa científica.
- Esta biópsia post-mortem **não tem caráter pericial**, não sendo indicada para causas de morte não naturais ou suspeita, não importando o tempo entre o evento e a morte do paciente.
- Também autorizo o uso das amostras coletadas provenientes do exame de biópsia post-mortem para ensino e pesquisa, desde que sejam cumpridas as normas vigentes no país para esse fim.
- Declaro que tive respostas para minhas perguntas e que fui informado de forma satisfatória sobre o(s) procedimento(s) acima descrito(s).

Sendo assim expreso meu livre consentimento esclarecido para a biopsia post-mortem no Hospital:

Assinatura do parente ou responsável: _____

Assinatura e CRM do médico solicitante: _____

Curitiba ____ de ____ de ____.

Este documento deve ser preenchido em uma única via, assinado por todos, e anexado ao prontuário do paciente.